

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

011131046 \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 1997-108970/199710

Related WPI Acc No: 2001-136717; 2002-033779; 2002-178584; 2002-328682

XRAM Acc No: C97-034838

**Miniaturised integrated nucleic acid diagnostic device - has body with  
reaction chambers between which fluid sample is directed by application  
of pressure differential**

Patent Assignee: AFFYMETRIX INC (AFFY-N)

Inventor: ANDERSON R C; FODOR S P A; LIPSHUTZ R J; RAVA R P; FODOR S; FODOR  
S P

Number of Countries: 072 Number of Patents: 011

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9702357	A1	19970123	WO 96US11147	A	19960627	199710 B
AU 9664049	A	19970205	AU 9664049	A	19960627	199721
EP 843734	A1	19980527	EP 96923572	A	19960627	199825
			WO 96US11147	A	19960627	
US 5856174	A	19990105	US 96589027	A	19960119	199909
US 5922591	A	19990713	US 95703	P	19950629	199934
			US 95859	P	19950703	
			US 96589027	A	19960119	
			US 96671928	A	19960627	
JP 11509094	W	19990817	WO 96US11147	A	19960627	199943
			JP 97505261	A	19960627	
<i>corr</i> <u>US 6043080</u>	A	20000328	US 95703	P	19950629	200023
			US 95859	P	19950703	
			US 96589027	A	19960119	
			US 98210025	A	19981211	
US 6197595	B1	20010306	US 95703	P	19950629	200115
			US 95859	P	19950703	
			US 96671928	A	19960627	
			US 98210025	A	19981211	
			US 99294700	A	19990419	
EP 843734	B1	20030326	EP 96923572	A	19960627	200323
			WO 96US11147	A	19960627	
			EP 2003459	A	19960627	
EP 1304388	A2	20030423	EP 96923572	A	19960627	200329
			EP 2003459	A	19960627	
DE 69626988	E	20030430	DE 626988	A	19960627	200336
			EP 96923572	A	19960627	
			WO 96US11147	A	19960627	

Priority Applications (No Type Date): US 96589027 A 19960119; US 95703 P  
19950629; US 95859 P 19950703; US 96671928 A 19960627; US 98210025 A  
19981211; US 99294700 A 19990419

Cited Patents: 1.Jnl.Ref; US 4426451; US 5252294; US 5304487; US 5384261;  
US 5498392; WO 9405414

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
WO 9702357	A1	E	123	C12P-019/34	

Designated States (National): AL AM AT AU AZ BB BG BR BY CA CH CN CZ DE  
DK EE ES FI GB GE HU IL IS JP KE KG KP KR KZ LK LR LS LT LU LV MD MG MK  
MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK TJ TM TR TT UA UG US UZ VN

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK EA ES FI FR GB GR IE IT KE  
LS LU MC MW NL OA PT SD SE SZ UG

AU 9664049	A			C12P-019/34	Based on patent WO 9702357
------------	---	--	--	-------------	----------------------------

EP 843734 A1 E C12P-019/34 Based on patent WO 9702357  
 Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
 MC NL PT SE  
 US 5856174 A C12M-001/34  
 US 5922591 A C12M-001/34  
 Provisional application US 95703  
 Provisional application US 95859  
 CIP of application US 96589027  
 CIP of patent US 5856174  
 Based on patent WO 9702357  
 Provisional application US 95703  
 Provisional application US 95859  
 Div ex application US 96589027  
 Div ex patent US 5856174  
 Provisional application US 95703  
 Provisional application US 95859  
 Div ex application US 96671928  
 CIP of application US 98210025  
 Div ex patent US 5922591  
 CIP of patent US 6043080  
 Related to application EP 2003459  
 Based on patent WO 9702357  
 EP 843734 B1 E C12P-019/34  
 Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
 MC NL PT SE  
 EP 1304388 A2 E C12Q-001/68 Div ex application EP 96923572  
 Div ex patent EP 843734  
 Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
 MC NL PT SE  
 DE 69626988 E C12P-019/34 Based on patent EP 843734  
 Based on patent WO 9702357

Abstract (Basic): WO 9702357 A

A miniature fluid system comprises a body with at least 2 discrete reaction chambers, each having a vent port and each is connected to a common chamber or channel. A pneumatic system selectively applies a pressure differential between the common chamber or channel and a selected one of the discrete chambers to drive a fluid sample between the interconnected regions.

USE - The system performs sample acquisition and prepn. operations in combination with sample analysis. It is esp. suited for nucleic acid based diagnostic applications and de novo sequencing applications.

ADVANTAGE - The device integrates sample acquisition, storage and analysis in a single, miniaturised unit.

Dwg.5a/15

Title Terms: MINIATURE; INTEGRATE; NUCLEIC; ACID; DIAGNOSE; DEVICE; BODY; REACT; CHAMBER; FLUID; SAMPLE; DIRECT; APPLY; PRESSURE; DIFFERENTIAL

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12M-001/34; C12N-001/00; C12P-019/34; C12Q-001/68; G01N-001/10

International Patent Class (Additional): B01L-001/00; B81B-001/00; C12M-001/40; C12N-015/09

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B03B; B04-C03; B04-E03; B04-L04A; B11-C08B; B11-C08E4; B11-C09; B12-K04F; D05-H18A

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M424 M740 M750 M903 N102 Q233 V753

Chemical Fragment Codes (M6):

\*02\* M903 P831 Q233 R023 R515 R523 R528 R639

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-509094

(43) 公表日 平成11年(1999) 8月17日

(51) Int.Cl.<sup>4</sup>

C 1 2 N 1/00  
15/09

識別記号

F I

C 1 2 N 1/00  
15/00

A  
A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全114頁)

(21) 出願番号 特願平9-505261  
(86) (22) 出願日 平成8年(1996) 6月27日  
(85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 12月26日  
(86) 国際出願番号 PCT/US 96/11147  
(87) 国際公開番号 WO 97/02357  
(87) 国際公開日 平成9年(1997) 1月23日  
(31) 優先権主張番号 60/000, 859  
(32) 優先日 1995年7月3日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(31) 優先権主張番号 60/000, 703  
(32) 優先日 1995年7月29日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 アフィメトリックス、インコーポレイティ  
ド  
アメリカ合衆国、カリフォルニア 95051、  
サンタクララ、セントラル エクスプレス  
ウェイ 3380  
(72) 発明者 アンダーソン、ロルフ シー、  
アメリカ合衆国、カリフォルニア 94043、  
マウンテンビュー、ウィンドミル パーク  
レーン 306  
(72) 発明者 リップシャッツ、ロバート ジェイ、  
アメリカ合衆国、カリフォルニア 94301、  
パロアルト、パロアルト アベニュー 970  
(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 統合された核酸診断装置

(57) 【要約】

本発明は、ミニチュア化された、統合された核酸診断装置及びシステム(522)を提供する。本発明の装置(522)は一般的に、1又は複数のサンプル獲得及び調製操作、並びに1又は複数のサンプル分析操作を実施することができる。たとえば、装置(522)は、単一の統合された単位(522)内に、サンプル獲得及び貯蔵、サンプル調製及びサンプル分析に関する操作のいくつか又はすべてを組み込むことができる。装置(522)は、種々の用途において有用であり、そして最も著しいことには、核酸に基づく診断用途及び新規配列決定用途において有用である。

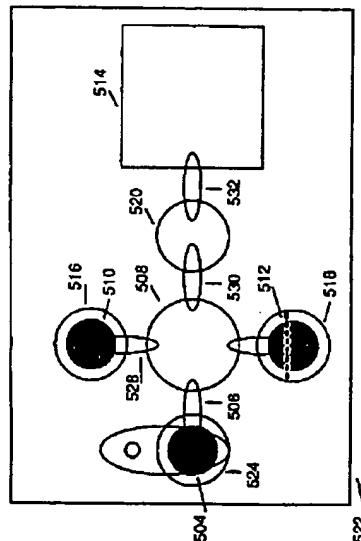


Figure 5a

## 【特許請求の範囲】

1. ミニチュア流体システムであって、  
少なくとも2つの別個の反応チャンバーを有する本体、前記反応チャンバーの個々は少なくとも1つのベント口を含んで成り、そして前記反応チャンバーの個々は共通チャンバー又はチャンネルに流体的に連結されており；  
前記共通チャンバー又はチャンネルと前記少なくとも2つの別個のチャンバーの少なくとも1つの選択されたチャンバーとの間に差圧を選択的に適用するための空気システム、それにより、前記差圧が前記共通チャンバー又はチャンネルと前記少なくとも1つの選択されたチャンバーとの間で、前記本体における流体サンプルを方向づける、を含んで成るシステム。
2. 前記ベント口が、前記ベント口を横切って配置されるガス透過性流体バリアーを含んで成る請求の範囲第1項記載のシステム。
3. 前記ガス透過性流体バリアーが疎水性膜である請求の範囲第2項記載のシステム。
4. 前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つが脱泡チャンバーであり、前記脱泡チャンバーが少なくとも2つのベント口を含んで成り、前記少なくとも2つのベント口の1つが前記チャンバーにおいて中間位置に配置され、それにより、前記チャンバーにおける少なくとも2つの別個の流体プラグを分離する泡が前記チャンバーを出、前記少なくとも2つの別個の流体プラグの連結を可能にする請求の範囲第1項記載のシステム。
5. 前記少なくとも2つの別個のチャンバーの個々と前記共通チャンネル又はチャンバーとの間の流体連結で調節可能弁をさらに含んで成る請求の範囲第1項記載のシステム。
6. 前記調節可能弁がダイヤフラム弁である請求の範囲第5項記載のシステム。
7. 前記空気システムが前記ダイヤフラム弁を偏向するために前記ダイヤフラム弁に差圧をさらに適用することができる請求の範囲第1項記載のシステム。
8. 前記ダイヤフラム弁の撓みが前記流体連結を開放する請求の範囲第7項記

載のシステム。

9. 前記チャンバーの個々が約0.05～約20mmの横断面寸法、及び約0.05～約5mmの深さの寸法を有する請求の範囲第1項記載のシステム。

10. 前記少なくとも2つのチャンバーが流体路を通して流体的に連結され、前記流体路が約10 $\mu$ m～約1000 $\mu$ mの横断面寸法及び約1～500 $\mu$ mの深さの寸法を有する請求の範囲第1項記載のシステム。

11. 前記空気システムが、前記流体サンプルを、前記少なくとも第1のチャンバーから前記少なくとも第2のチャンバーに移動するために、前記少なくとも第1のチャンバーと前記少なくとも第2のチャンバー間に差圧を適用するための空気マニホールドを含んで成る請求の範囲第1項記載のシステム。

12. 前記空気システムが、第1圧力で前記少なくとも第1のチャンバー及び第2圧力で前記第2のチャンバーを維持するために差圧供給システムを含んで成り、前記第1圧力が周囲圧力よりも高く、そして前記第2圧力が前記第1圧力よりも高く、それにより、前記第2チャンバーが周囲圧力にされる場合、前記第1圧力が前記第2チャンバー中に前記第1チャンバー中の液体サンプルを押し進める請求の範囲第1項記載のシステム。

13. 前記差圧供給システムが、

圧力源；

前記圧力源を、それぞれ、前記少なくとも第1及び第2のチャンバーに流体的に連結する少なくとも第1及び第2の通路；

前記圧力源と前記第1チャンバーとの間の前記第1通路に配置される第1流体抵抗、前記第1流体抵抗は前記圧力源から前記第1圧力に圧力を変圧し；

前記圧力源と前記第2チャンバーとの間の前記第2通路に配置される第2流体抵抗、前記第2流体抵抗は前記圧力源から前記第2圧力に圧力を変圧し；及び

それぞれ前記第1及び第2のチャンバーにおける第1及び第2の開放可能なクロージャ、これにより、前記第1又は第2クロージャの開放が前記第1又は第2のチャンバーの周囲圧力への達成を可能にする、を含んで成る請求の範囲第12項記載のシステム。

14. 前記第1及び第2の流体抵抗が、前記第1及び第2の通路を前記第1及び第2のチャンバーに連結する1又は複数の流路を独立して含んで成り、前記第1の流体抵抗が前記第2の流体抵抗よりも小さな横断面積を有する請求の範囲第13項記載のシステム。

15. 前記空気システムが、第1圧力で前記第1チャンバー及び第2圧力で前記第2チャンバーを維持するために差圧供給システムを含んで成り、前記第2圧力が周囲圧力よりも低く、そして前記第1圧力が前記第2圧力よりも低く、それにより、前記第1チャンバーが周囲圧力にされる場合、前記第2圧力が前記第2チャンバー中に前記第1チャンバー中の液体サンプルを引き込む請求の範囲第1項記載のシステム。

16. 前記差圧供給システムが、  
圧力源；

前記圧力源を、それぞれ、前記少なくとも第1及び第2のチャン

バーに流体的に連結する少なくとも第1及び第2の通路；

前記圧力源と前記第1チャンバーとの間の前記第1通路に配置される第1流体抵抗、前記第1流体抵抗は前記圧力源から前記第1圧力に圧力を変圧し；

前記圧力源と前記第2チャンバーとの間の前記第2通路に配置される第2流体抵抗、前記第2流体抵抗は前記圧力源から前記第2圧力に圧力を変圧し；及び

それぞれ前記第1及び第2のチャンバーにおける第1及び第2の開放可能なクロージャー、これにより、前記第1又は第2クロージャーの開放が前記第1又は第2のチャンバーの周囲圧力への達成を可能にする、を含んで成る請求の範囲第15項記載のシステム。

17. 前記第1及び第2の流体抵抗が、前記第1及び第2の通路を前記第1及び第2のチャンバーに連結する1又は複数の流体通路を独立して含んで成り、前記第1の流体抵抗が前記第2の流体抵抗よりも小さな横断面積を有する請求の範囲第16項記載のシステム。

18. 前記システムが、前記少なくとも1つのチャンバー内の温度を調節するために、前記少なくとも2つのチャンバーの少なくとも1つに隣接する温度調節器



をさらに含んで成る請求の範囲第1項記載のシステム。

19. 前記温度調節器が熱電温度調節器を含んで成る請求の範囲第18項記載のシステム。

20. 前記温度調節器が抵抗ヒーターを含んで成る請求の範囲第19項記載のシステム。

21. 前記抵抗ヒーター要素が、NiCr／ポリイミド／銅ラミネート加熱要素である請求の範囲第20項記載のシステム。

22. 前記温度調節されたチャンバー内に配置される温度センサーをさらに含んで成る請求の範囲第20項記載のシステム。

23. 前記温度センサーがサーモカップルである請求の範囲第22項記載のシステム。

24. 前記温度センサーが、抵抗温度計である請求の範囲第23項記載のシステム。

25. 前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つが細胞溶解チャンバーであり、そしてそこに配置される細胞溶解システムを、流体サンプルにおける細胞を溶解するために含んで成る請求の範囲第1項記載のシステム。

26. 前記細胞溶解システムが、前記細胞溶解チャンバーに隣接して配置される音波エネルギー源を含んで成る請求の範囲第25項記載のシステム。

27. 前記細胞溶解チャンバーが、細胞溶解を増強するために前記細胞溶解チャンバーの内面上に加工された微小構造体を含む請求の範囲第25項記載のシステム。

28. 前記細胞溶解チャンバーが、前記細胞溶解チャンバーのpHを変えるための電解性pH調節システムを含む請求の範囲第25項記載のシステム。

29. 前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つが流体サンプルの成分を分析するためのハイブリダイゼーションチャンバーであり、前記ハイブリダイゼーションチャンバーがポリマーアレイを含み、前記ポリマーアレイが単一の支持体の表面に結合される多くの異なったポリマー配列を含み、前記多くの異なったポリマー配列の個々が異なった既知の位置において前記表面に結合されて

いる請求の範囲第1項記載のシステム。

30. 前記ポリマーアレイが前記単一の支持体の前記表面に結合される少なくとも100の異なったポリマー配列を含んで成り、前記多くの異なったポリマー配列の個々が異なった既知の位置において前

記表面に結合されている請求の範囲第29項記載のシステム。

31. 前記ポリマーアレイが前記単一の支持体の前記表面に結合される少なくとも1000の異なったポリマー配列を含んで成り、前記多くの異なったポリマー配列の個々が異なった既知の位置において前記表面に結合されている請求の範囲第29項記載のシステム。

32. 前記ポリマーアレイが前記単一の支持体の前記表面に結合される少なくとも10,000の異なったポリマー配列を含んで成り、前記多くの異なったポリマー配列の個々が異なった既知の位置において前記表面に結合されている請求の範囲第29項記載のシステム。

33. 前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つが、核酸増幅システムを含んで成る請求の範囲第1項記載のシステム。

34. 前記核酸増幅が、少なくとも2つの異なった温度間で前記少なくとも1つのチャンバーにおける流体サンプルを循環するためのシステムを含む請求の範囲第33項記載のシステム。

35. 前記循環のためのシステムが少なくとも2つの別々の温度調節されたチャンバーを含んで成り、前記少なくとも2つのチャンバーが少なくとも2つの異なった温度で維持され、それにより、前記サンプルが、前記少なくとも2つの温度調節されたチャンバー間で前記流体サンプルを前後に移動することによって、前記少なくとも2つの温度間で循環される請求の範囲第34項記載のシステム。

36. 前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つが、前記サンプルにおける他の汚染物から前記サンプルにおける核酸を分離するための核酸精製システムを含んで成る請求の範囲第1項記載のシステム。

37. 前記核酸精製システムが、前記汚染物から前記核酸を分離するための分離マトリックスを含んで成る請求の範囲第36項記載のシステム。

38. 前記分離マトリックスが前記サンプルにおける前記核酸を選択的に結合するための官能基を含んで成る請求の範囲第37項記載のシステム。

39. 前記官能基がポリ- Tオリゴヌクレオチドを含んで成る請求の範囲第38項記載のシステム。

40. 前記核酸精製システムが、前記汚染物から前記核酸を分離するために、前記流体サンプルに電場を適用するための電気泳動システムをさらに含んで成る請求の範囲第37項記載のシステム。

41. 前記分離マトリックスがゲルマトリックスを含んで成る請求の範囲第37項記載のシステム。

42. 前記分離マトリックスが、前記サンプルと前記電気泳動システムのアノードとの間に配置される膜を含んで成る請求の範囲第37項記載のシステム。

43. 前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つが逆転写チャンバーであり、前記逆転写チャンバーが、有効量の逆転写酵素及び少なくとも4種のデオキシヌクレオシド三リン酸をそこに配置している請求の範囲第1項記載のシステム。

44. 前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つがインビトロ逆転写チャンバーであり、前記インビトロ転写チャンバーが有効量のRNAポリメラーゼ及び少なくとも4種の異なったヌクレオシド三リン酸をそこに配置している請求の範囲第1項記載のシステム。

45. 前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つが流体サンプルにおける核酸を断片化するために、核酸断片化システムを含んで成る請求の範囲第1項記載のシステム。

46. 前記断片化システムが、前記断片化チャンバーに隣接して配置される、集中された圧電要素を含んで成る請求の範囲第45項記載

のシステム。

47. 前記断片化システムが、前記チャンバーの第1表面上に加工される一連の微小構造体をさらに含んで成る請求の範囲第46項記載のシステム。

48. 前記断片化システムが、前記流体サンプルがそれを通してポンプで吸上げ

られる少なくとも1つのチャネルを含んで成り、前記チャネルが高い剪断速度を生成するためにミクロン以下の横断面寸法を有する請求の範囲第45項記載のシステム。

49. 前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つのチャンバー内の前記流体サンプルを混合するための流体混合システムをさらに含んで成る請求の範囲第1項記載のシステム。

50. 前記流体混合システムが、前記少なくとも2つのチャンバーの少なくとも1つのチャンバーに隣接して配置される圧電要素を含んで成る請求の範囲第49項記載のシステム。

51. 前記流体混合システムが、前記少なくとも2つのチャンバーのうち前記少なくとも1つのチャンバーに隣接し、そしてそれに流体的に連結される別のチャンバーを含んで成り、それにより、前記流体サンプルが前記流体サンプルを混合するために前記少なくとも1つのチャンバーと前記別のチャンバーとの間を流される請求の範囲第49項記載のシステム。

52. 前記混合システムが、  
前記少なくとも1つのチャンバー内に配置される多くの金属粒子；  
前記少なくとも1つのチャンバーに隣接する電磁場発生器、それにより、前記電磁場発生器が活性化される場合、前記金属粒子が前記チャンバーの前記少なくとも1つのチャンバー混合内容物内で振動される、を含んで成る請求の範囲第49項記載のシステム。

53. 前記混合システムがハイブリダイゼーションチャンバーに含まれる流体サンプルを混合する請求の範囲第49項記載のシステム。

54. 前記流体輸送システムが、前記本体に配置され、そして前記多くのチャンバーの少なくとも1つのチャンバーに流体的に連結されるマイクロポンプを含んで成る請求の範囲第1項記載のシステム。

55. 前記マイクロポンプが電気泳動ポンプを含んで成る請求の範囲第54項記載のシステム。

56. ミニチュア流体システムであって、

そこに配置される少なくとも第1及び第2のチャンバーを有する本体、前記少なくとも第1及び第2のチャンバーの個々が流体入口を有し、そして流体連結して存在し、そして前記少なくとも第1及び第2のチャンバーのうち少なくとも1つが流体サンプルの成分を分析するためのハイブリダイゼーションチャンバーであり、前記ハイブリダイゼーションチャンバーがポリマーアレイを含み、前記ポリマーアレイが単一の支持体の表面に結合される多くの異なったポリマー配列を含み、前記多くの異なったポリマー配列の個々が異なった既知の位置において前記表面に結合されており；

前記システム中に流体サンプルを導入するために、前記第1及び第2のチャンバーの少なくとも1つに流体的に連結されるサンプル入口；

前記少なくとも第1のチャンバーから前記少なくとも第2のチャンバーに流体サンプルを移動するための流体輸送システムを含んで成るシステム。

57. 前記ポリマーアレイが前記単一の支持体の前記表面に結合される少なくとも100の異なったポリマー配列を含んで成り、前記多くの異なったポリマー配列の個々が異なった既知の位置において前

記表面に結合されている請求の範囲第56項記載のシステム。

58. 前記ポリマーアレイが前記単一の支持体の前記表面に結合される少なくとも1000の異なったポリマー配列を含んで成り、前記多くの異なったポリマー配列の個々が異なった既知の位置において前記表面に結合されている請求の範囲第56項記載のシステム。

59. 前記ポリマーアレイが前記単一の支持体の前記表面に結合される少なくとも10,000の異なったポリマー配列を含んで成り、前記多くの異なったポリマー配列の個々が異なった既知の位置において前記表面に結合されている請求の範囲第56項記載のシステム。

60. 前記本体が、前記オリゴヌクレオチドアレイに対する前記流体サンプルの成分のハイブリダイゼーションを検出するために前記ハイブリダイゼーションチャンバー上に配置される透明領域をさらに含んで成る請求の範囲第56項記載のシステム。

61. ミニチュア流体システムであって、

そこに配置される少なくとも2つの別個のチャンバーを有する本体；前記少なくとも2つのチャンバーの個々は前記少なくとも2つのチャンバーの少なくとも1つに流体的に連結されており；

前記少なくとも1つのチャンバー中に流体サンプルを導入するために、前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つに流体的に連結されるサンプル入口；

前記少なくとも2つのチャンバーの少なくとも第1のチャンバーから前記少なくとも2つのチャンバーの少なくとも第2のチャンバー流体サンプルを移動するための流体輸送システム；及び

前記流体サンプルの成分を分離するための分離チャネル、前記分離チャネルは前記チャンバーの少なくとも1つに流体的に連結され、そして前記分離チャネルを通して電圧を適用するために前記分離チャネルの反対端と電氣的に接触して少なくとも第1及び第2の電

極を含む、を含んで成るシステム。

62. 前記少なくとも2つのチャンバーの少なくとも1つが拡張反応チャンバーであり、前記拡張反応チャンバーが前記分離チャネルに流体的に連結され、前記拡張反応チャンバーが、DNA ポリメラーゼ、デオキシヌクレオシド三リン酸、及びジデオキシヌクレオシド三リン酸から成る群から選択された1又は複数の試薬をそこに配置している請求の範囲第61項記載のシステム。

63. 少なくとも4つの分離チャネル及び少なくとも4つの拡張チャンバーをさらに含んで成り、前記分離チャネルの個々が前記少なくとも4つの拡張チャンバーの別々のチャンバーに流体的に連結され、前記別々の拡張チャンバーの個々が異なったジデオキシヌクレオシド三リン酸をそこに配置している請求の範囲第61項記載のシステム。

64. 前記本体が、前記流体サンプルの前記成分を検出するために前記分離チャネル上に配置される透明な領域をさらに含んで成る請求の範囲第61項記載のシステム。

65. ミニチュア流体システムであって、

そこに配置される少なくとも2つのチャンバーを有する本体、前記少なくとも2つのチャンバーの少なくとも1つがインビトロ転写反応チャンバーであり、前記インビトロ転写反応チャンバーが有効量のRNAポリメラーゼ及び4種の異なるヌクレオシド三リン酸をそこに配置している；

前記少なくとも1つのチャンバー中に流体サンプルを導入するために、前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つに流体的に連結されるサンプル入口；及び

前記少なくとも2つのチャンバーの少なくとも第1のチャンバーから前記少なくとも2つのチャンバーの少なくとも第2のチャンバ

ーに流体サンプルを移動するための流体輸送システムを含んで成るシステム。

66. ミニチュア流体システムであって、

そこに配置される少なくとも2つのチャンバーを有する本体、前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つが前記流体サンプルにおける細胞を溶解するために細胞溶解チャンバーであり、前記細胞溶解チャンバーが細胞溶解システムを含んで成り；

前記少なくとも1つのチャンバー中に流体サンプルを導入するために、前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つに流体的に連結されるサンプル入口；及び

前記少なくとも2つのチャンバーの少なくとも第1のチャンバーから前記少なくとも2つのチャンバーの少なくとも第2のチャンバーに流体サンプルを移動するための流体輸送システムを含んで成るシステム。

67. 前記細胞溶解システムが前記溶解チャンバーの内面上に加工された一連の微小構造体を含んで成り、それにより、前記微小構造体上の前記流体サンプルの流れが前記流体サンプルにおける細胞の溶解をもたらす請求の範囲第66項記載のシステム。

68. 前記細胞溶解システムが、前記微小構造体上に前記流体サンプルを流すために前記細胞溶解チャンバーに隣接して配置される圧電要素を含んで成る請求の

範囲第67項記載のシステム。

69. 前記細胞溶解チャンバーが、前記細胞溶解チャンバーにおけるpHを変えるために、電解pH調節システムを含んで成る請求の範囲第67項記載のシステム。

70. ミニチュア流体システムであって、

そこに配置される少なくとも2つのチャンバーを有する本体、前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つが、前記流体

サンプルにおける他の汚染物から前記流体サンプルにおける核酸を分離するために、核酸精製チャンバーであり；

前記少なくとも1つのチャンバー中に流体サンプルを導入するために、前記少なくとも2つのチャンバーのうち少なくとも1つに流体的に連結されるサンプル入口；及び

前記少なくとも2つのチャンバーの少なくとも第1のチャンバーから前記少なくとも2つのチャンバーの少なくとも第2のチャンバーに流体サンプルを移動するための流体輸送システムを含んで成るシステム。

71. 前記核酸精製システムが、前記流体サンプルにおける核酸を選択的に結合するが、しかし前記他の汚染物は結合しない分離マトリックスを含んで成る請求の範囲第70項記載のシステム。

72. 前記マトリックスがシリカマトリックスを含んで成る請求の範囲第71項記載のシステム。

73. 前記シリカマトリックスがガラスウールを含んで成る請求の範囲第72項記載のシステム。

74. 前記マトリックスが、固体支持体に結合されるポリ- $\alpha$ -オリゴヌクレオチドを有する固体支持体を含んで成る請求の範囲第71項記載のシステム。

75. ミニチュア流体システムであって、

流路により第2チャンバーに流体的に連結される少なくとも第1のチャンバーを有する本体；

前記システム中に流体サンプルを導入するために、前記第1チャンバーに流体的に連結されるサンプル入口；



第1圧力で前記第1のチャンバー及び第2圧力で前記第2のチャンバーを維持するために差圧供給システム、前記第1圧力が周囲圧力よりも高く、そして前記第2圧力が前記第1圧力よりも高く、そ

れにより、前記第2チャンバーが周囲圧力にされる場合、前記第1圧力が前記第2チャンバー中に前記第1チャンバー中の液体サンプルを押し進める、を含んで成るシステム。

76. 前記差圧供給システムが、  
圧力源：

前記圧力源を、それぞれ、前記少なくとも第1及び第2のチャンバーに流体的に連結する少なくとも第1及び第2の通路；

前記圧力源と前記第1チャンバーとの間の前記第1通路に配置される第1流体抵抗、前記第1流体抵抗は前記圧力源から前記第1圧力に圧力を変圧し；

前記圧力源と前記第2チャンバーとの間の前記第2通路に配置される第2流体抵抗、前記第2流体抵抗は前記圧力源から前記第2圧力に圧力を変圧し；及び

それぞれ前記第1及び第2のチャンバーにおける第1及び第2の開放可能なクロージャー、これにより、前記第1又は第2クロージャーの開放が前記第1又は第2のチャンバーの周囲圧力への達成を可能にする、を含んで成る請求の範囲第75項記載のシステム。

77. 前記第1及び第2の流体抵抗が、前記第1及び第2の通路を前記第1及び第2のチャンバーに連結する1又は複数の流路を独立して含んで成り、前記第1の流体抵抗が前記第2の流体抵抗よりも小さな横断面積を有する請求の範囲第76項記載のシステム。

78. 前記第1及び第2流体抵抗が、前記第1及び第2のチャンバーに前記第1及び第2の通路を連結する1又は複数の流路を独立して含んで成り、前記第1流体抵抗の前記流路が前記第2流体抵抗の前記流路よりも長い長さを有する請求の範囲第76項記載のシステム。

79. ミニチュア流体システムであって、

第2チャンバーに流体的に連結される少なくとも第1のチャンバーを有する本体；

前記少なくとも第1のチャンバーに流体サンプルを導入するために、前記第1チャンバーに流体的に連結されるサンプル入口；

第1圧力で前記第1のチャンバー及び第2圧力で前記第2のチャンバーを維持するために差圧供給源、前記第2圧力が周囲圧力よりも低く、そして前記第1圧力が前記第2圧力よりも低く、それにより、前記第1チャンバーが周囲圧力にされる場合、前記第2圧力が前記第2チャンバー中に前記第1チャンバー中の液体サンプルを引き込める、を含んで成るシステム。

80. 前記少なくとも第1のチャンバーが流路により前記第2チャンバーに流体的に連結されている請求の範囲第79項記載のシステム。

81. 前記差圧供給システムが、

圧力源；

前記圧力源を、それぞれ、前記少なくとも第1及び第2のチャンバーに流体的に連結する少なくとも第1及び第2の通路；

前記圧力源と前記第1チャンバーとの間の前記第1通路に配置される第1流体抵抗、前記第1流体抵抗は前記圧力源から前記第1圧力に圧力を変圧し；

前記圧力源と前記第2チャンバーとの間の前記第2通路に配置される第2流体抵抗、前記第2流体抵抗は前記圧力源から前記第2圧力に圧力を変圧し；及び

それぞれ前記第1及び第2のチャンバーにおける第1及び第2の開放可能なクロージャ、これにより、前記第1又は第2クロージャの開放が前記第1又は第2のチャンバーの周囲圧力への達成を可能にする、を含んで成る請求の範囲第80項記載のシステム。

82. 前記第1及び第2の流体抵抗が、前記第1及び第2の通路を前記第1及び第2のチャンバーに連結する1又は複数の流路を独立して含んで成り、前記第1の流体抵抗が前記第2の流体抵抗よりも大きな横断面積を有する請求の範囲第81項記載のシステム。

83. 前記第1及び第2流体抵抗が、前記第1及び第2のチャンバーに前記第1

及び第2の通路を連結する1又は複数の流路を独立して含んで成り、前記第1流体抵抗の前記流路が前記第2流体抵抗の前記流路よりも短い長さを有する請求の範囲第81項記載のシステム。

84. ミニチュア流体システムにおける流体サンプルを方向づけるための方法であって、

そこに配置される少なくとも第1及び第2のチャンバーを有するマイクロ加工された装置を供給し、ここで前記少なくとも第1及び第2のチャンバーの個々は共通チャンバー又はチャンネルと流体連結されており、それぞれ、前記流体連結を横切って配置される少なくとも第1及び第2の調節可能弁を有し、そして少なくとも1つのベントを包含し；

前記共通チャンバー又はチャンネルに対して正の圧力を適用し；

前記少なくとも第1の調節可能弁を選択的に開放し、それにより前記正の圧力が前記第1のチャンバー中に前記共通チャンバー又はチャンネルからの前記流体サンプルを押し進めることを含んで成る方法。

85. 前記少なくとも第1のチャンバーに正の圧力を適用し、そして前記少なくとも第1の調節可能弁を選択的に開放することをさらに含んで成り、それにより、前記正の圧力が前記共通チャンバー又はチャンネル中に前記少なくとも第1のチャンバーからの前記流体サンプルを押し進める請求の範囲第84項記載の方法。

86. 前記ベントが、そのベントを横切って封止可能的に配置される疎水性膜を含んで成り、それにより、前記サンプルが前記疎水性膜に接触する場合、前記少なくとも第1のチャンバー中への前記流体サンプルの流れが停止する請求の範囲第85項記載の方法。

87. 前記少なくとも第1及び第2の調節可能弁が空氣的に選択開放される請求の範囲第84項記載の方法。

88. マイクロ加工された流体システムにおける少なくとも2種の別個の流体を混合するための方法であって、

マイクロ加工されたチャンネルにおける中間位置で配置されるベントを有するマイクロ加工されたチャンネルを供給し、前記ベントはそのベントを横切って配置さ

れるガス透過性流体バリアーを有し；

ガス気泡により分離される前記チャンネル中に前記少なくとも2種の別個の流体成分を導入し；

前記少なくとも2種の別個の流体成分を前記ペントを越えて流し、それにより、前記気泡が前記ペントから出、前記少なくとも2種の流体成分の混合を可能にすることを含んで成る方法。

89. 前記ガス透過性流体バリアーが疎水性膜である請求の範囲第88項記載の方法。

90. ミニチュア流体システムにおける既知体積の流体を反復して測定するための方法であって、

そこに配置される少なくとも第1及び第2のチャンバーを有するマイクロ加工された装置を供給し、ここで前記少なくとも第1及び第2のチャンバーが流体連結しており、個々は少なくとも1つのガス抜き口を含んで成り、そして前記チャンバーの少なくとも1つが既知体積を有する容積測定チャンバーであり；

前記容積測定チャンバーを、前記流体の第1アリコートを作成するために前記流体により充填し；

前記流体の前記第1アリコートを前記少なくとも第2のチャンバーに輸送し；  
そして

前記充填及び輸送段階を反復することを含んで成る方法。

91. 前記供給段階において提供される前記装置の前記チャンバーの個々が、約0.05～約20mmの横断面寸法及び約0.05～約5mmの深さの寸法を有する請求の範囲第90項記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

### 統合された核酸診断装置

#### 発明の背景

高分子の構造と機能との間の関係は、生物学的システムの理解において基本的に重要なものである。それらの関係は、たとえば酵素の機能、シグナルタンパク質の構造、細胞がお互いと連絡する手段、並びに細胞制御及び代謝フィードバックの機構を理解するために重要である。

遺伝情報は、生命過程の存続においては重要である。生命は実質的に情報に基づいており、そしてその遺伝子の内容は生物の生長及び生殖を制御する。すべての生存システムの決定的な特徴である、ポリペプチドのアミノ酸は、細胞の遺伝物質によりコードされる。さらに、たとえば酵素、機能的タンパク質及び構造タンパク質としてのそれらのポリペプチドの性質は、それらを構成するアミノ酸の配列により決定される。構造及び機能は不可欠に関連しているので、多くの生物学的機能は、それらの機能を提供する基礎をなす構造特徴を解明することにより説明することができ、そしてそれらの構造はポリヌクレオチド配列の形でのその基礎をなす遺伝情報により決定される。コードポリペプチドの他に、ポリヌクレオチド配列もまた、遺伝子発現の制御及び調節に特異的に関与する。

この遺伝情報の研究は、生命過程のより良好な理解を提供し、そして多数の疾病の診断及び処理においてひじょうに価値あることが証明されている。特に、ゲノムの特定部分の突然変異、欠失又は反復により引き起こされる障害は、遺伝子技法を用いて容易に診断され、そして／又は処理され得る。同様に、外因性剤により引き起こ

される障害は、その外来物質、たとえば細菌、又はウィルスDNA に対してユニークである遺伝子材料を検出することによって診断され得る。

現在の遺伝子方法は一般的に、それらの遺伝子配列を同定することができるが、そのような方法は一般的に、核酸配列を解明するための多くの別個の工程に依存し、そして個々の工程が全体の工程中にエラーのための可能性を導びく。それらの工程はまた、多くの明確な規律、たとえば化学、分子生物学、医学及び他の

ものに起因する。従って、単一の工程で、最少の費用で、且つ操作の最大の容易さを伴って、遺伝子診断に使用される種々の工程を統合することが所望される。

微流体装置の製造の開発が興味の対象である。典型的には、半導体製造技術の進歩は、微小機構構造物、たとえば微小ポンプ、微小弁及び同様のもの、並びにミニチュアチャンバー及び流れ通路を包含する微流体装置の製造に由来して来た。

多くの研究が、特に遺伝子分析に包含される工程のいくつかの小型化へのそれらの微小加工技法の使用に試みられて来た。たとえば、Northrup and Whiteによる、公開されたPCT 出願WO94/05414号（すべての目的のためにその全体を引用により本明細書に組込む）は、検体からの核酸の収集及び増幅のための統合されたマイクロPCR 装置を報告している。しかしながら、核酸分析に包含される種々の加工及び分析操作を組み合わせ装置のための必要性が存在する。本発明は、それらの及び他の必要性を満たす。

#### 発明の要約

本発明は、一般的に、種々の調製及び分析操作を実施するためのミニチュアの統合された流体システム、及びそれらのシステムを操

作するための方法、並びにそれらのシステムの使用方法を提供する。第1の観点においては、本発明は、その中に配置される少なくとも第1及び第2チャンバーを有する本体を含んで成るミニチュア流体システムを提供する。それらの第1及び第2チャンバーの個々は、流体入口を有し、そして流体と連絡して存在する。それらの第1及び第2チャンバーの少なくとも1つは、流体サンプルの成分を分析するためのハイブリダイゼーションチャンバーである。そのハイブリダイゼーションチャンバーは、単一の支持体の表面に結合される多くの異なったポリマー配列を有するポリマーアレイを包み、前記多くの異なったポリマー配列の個々は異なった既知の位置でその表面に結合される。システムはさらに、システム中に流体サンプルを導入するための、前記第1及び第2チャンバーの少なくとも1つに流体連絡されるサンプル入口、及び前記第1チャンバーから前記第2チャンバー流体サンプルを移動するための流体輸送システムを含む。

好ましい態様においては、流体指示システムは、第1チャンバーから第2チャンバーに前記流体サンプルを移動するために、第1チャンバーと第2チャンバーとの間に差圧を適用するための空気マニホールドを含んで成る。

関連する観点において、本発明は、上記と実質的に同じであるが、但し、ハイブリダイゼーションチャンバーの代わりに又はその他に、前記流体サンプルの成分を分離するための分離チャンネルを含んで成るミニチュア流体システムを提供する。その分離チャンネルは前記チャンバーの少なくとも1つと流体的に連結され、そして前記分離チャンネルを通して電圧を適用するために分離チャンネルの反対端と電気的に接触して少なくとも第1及び第2電極を含む。

同様に、さらなる観点においては、本発明は上記と実質的に類似

する流体システムを提供するが、但し、前記チャンバーの少なくとも1つはインビトロ転写反応チャンバーを含んで成り、前記インビトロ転写反応チャンバーは、そこに配置される、有効量のRNAポリメラーゼ及び4種の異なったヌクレオシド三リン酸を有する。

さらに、前記システムは、チャンバーの少なくとも1つが、前記流体サンプルにおける細胞を溶解するための細胞溶解システムを含む細胞溶解チャンバーである本体を含んで成る。

さらに関連する態様においては、チャンバーの少なくとも1つは、前記流体サンプルにおける他の汚染物から前記流体サンプルにおける核酸を分離するための核酸精製チャンバーである。

本発明はまた、システムを通して流体を輸送するための差圧供給システムを含んで成るミニチュア流体システムを提供する。特に、1つの観点において、本発明は、流体通路により第2反応チャンバーに流体連絡される少なくとも1つの第1反応チャンバーを有する本体を含むミニチュア流体システムを提供する。システムはまた、システム中に流体サンプルを導入するための、第1チャンバーに流体的に連結されるサンプル入口を含む。システムはさらに、第1圧力で第1チャンバーを及び第2圧力で第2チャンバーを維持するための差圧供給システムを包含し、ここで、前記第1圧力は周囲圧力よりも高く、そして前記第2圧力は前記

第1圧力よりも高い。前記第2チャンバーが周囲圧力にされる場合、前記第1圧力は、前記第1圧力における液体サンプルを前記第2チャンバー押し進める。

他の観点においては、流体システムは、第1圧力で前記第1チャンバーを及び第2圧力で前記第2チャンバーを維持するための差圧供給源を用い、ここで前記第2圧力は周囲圧力よりも低く、そして前記第1圧力は前記第2圧力よりも低い。前記第1チャンバーが周囲圧力にされる場合、前記第2圧力が前記第1チャンバーにおける

液体サンプルを第2チャンバー中に抜取る。

本発明はまた、ミニチュア又はマイクロ流体システムにおける流体を方向づけ、制御し、そして操作するための方法を提供する。

たとえば、1つの観点において、本発明は、そこに配置される少なくとも第1及び第2チャンバーを有するマイクロ加工された装置を供給することを含んで成る、ミニチュア流体システムにおける流体サンプルを方向づけるための方法を提供し、ここで前記少なくとも第1及び第2チャンバーの個々は共通チャンバー又はチャネルと流体連結して存在し、前記流体連結を通して配置される少なくとも第1及び第2調節可能弁をそれぞれ有し、そして少なくとも1つのベントを含む。前記方法は前記共通チャンバー又はチャネルに正圧を適用することを含んで成る。前記少なくとも第1の調節可能な弁が選択的に開口され、それにより、正圧が共通チャンバー又はチャネルからの流体サンプルを第1チャンバーに押し進める。

前記方法は、前記第1チャンバーに正圧を適用し、そして前記少なくとも第1の調節可能弁を選択的に開口することをさらに含んで成り、それにより前記正圧が前記少なくとも第1のチャンバーからの前記流体サンプルを前記共通チャンバー又はチャネルに押し進める。

本発明はまた、マイクロ加工された流体システムに少なくとも2つの別個の流体成分を混合する方法を提供する。特に、前記方法は、前記チャネルにおける中間位置で配置されるベントを有するマイクロ加工されたチャネルを供給することを含んで成る。典型的には、前記ベントは、そのベントを通して配置されるガス



透過性流体バリアーを包含する。次に、少なくとも2種の離散流体成分が、ガス気泡により分離されるチャンネル中に導入される。ベントを通しての前記少なくとも2種の流体成分の流れに基づいて、前記バブルがベ

ントを出、前記少なくとも2種の成分の混合を可能にする。

本発明はまた、ミニチュア流体システムにおいて既知体積の流体を反復的に測定するための方法を提供する。特に、前記方法は、そこに配置される少なくとも第1及び第2チャンバーを有するマイクロ加工された装置を供給することを含んで成り、ここで前記少なくとも第1及び第2チャンバーは流体連絡して存在し、そして前記チャンバーの少なくとも1つが既知の体積を有する容積測定チャンバーである。前記容積測定チャンバーは、流体の第1アリコートを作成するために流体により満たされている。次に、このアリコートが少なくとも第2のチャンバーに輸送され、そして前記充填及び輸送段階が反復される。

#### 図面の簡単な説明

図1は、サンプルからの核酸の分析のための核酸診断システムの図的な表示である。

図2a及び2bは、破断図からの2種の別々の反応チャンバーデザインの図示である。

図3は、一連の幾何学的に配置された多くの反応チャンバーを有するミニチュアの統合された診断装置の図示である。

図4A-Cは、微小細管電気泳動装置の表示である。図4A及び4Bは微小細管のためのもう1つの負荷方策を実施するために形成された微小細管を示し、そして図4Cは運転モードでのその微小細管を示す。

図5Aは、中心に集められた幾何学構造を用いるミニチュアの統合された装置の上面図を示す。図5Bは、同じ装置の側面図であり、ここで中心のチャンバーはポンピングチャンバーであり、そして封止反応チャンバーのためのダイヤフラム弁構造を用いる。

図6は、統合されたミニチュア装置内に流体を輸送するための空気制御マニホ

ールドの図示である。図6Aは、負圧、又は真空の適用のために適切なマニホールド形状を示し、そして図6Bは正圧の適用のためのマニホールド形状を示す。図6Cは、いくつかの反応チャンバー間の流体の移動のための圧力プロファイルを示す。

図7Aは、反応チャンバーの内容物の混合に使用するためのPZT要素を組み込む反応チャンバーの図示である。図7Bは、図7Aに示されるようなPZT混合要素を適用する反応チャンバー内の混合を示す。図7Cは、機械的混合、音波混合、不活性ハイブリダイゼーション及び最適化された音波混合を用いてのハイブリダイゼーション強度の比較を示す棒グラフである。

図8は、ミニチュアの統合された装置と共に使用するための基本学位の側面図及び上面図である。

図9は、ミニチュアの統合された装置における熱循環の温度-時間プロフィール、及びプログラムされた循環パラメーターの表示である。

図10Aは、RNA断片化反応の時間経過を示すゲルである。図10Bは、マイクロチャンバー対対照(試験管)におけるインビトロ転写反応の生成物の比較を示すゲルである。図10Cは、PCR熱サイクラーにおいて生成されたPCR生成物及びマイクロ反応器により生成された生成物の比較である。

図11は、電気pH調節システムを用いる反応チャンバーの1つの態様を示す。

図12A-Cは、ガス透過性流体バリアー結合のベント、たとえば不十分に湿潤するか又は疎水性の膜、及び空氣的に調節された弁を用いる空気流体方向づけシステムを用いるミニチュアの統合された装置の図示である。図12Aは、このシステムを用いる単一チャンバ

ーの1つの態様である。図12Bは、ガス気泡により分離される離散流体プラグを結合するための脱泡チャンバーの図示である。図12Cは、ガス抜きチャンバー、計量又は容積測定チャンバー、貯蔵及び反応チャンバーを包含する種々のチャンバーを有する統合された装置でのこのシステムを図的に示す。図12Dは、図12Cに図的に示されるシステムを具体化する射出成形支持体の例示である。

図13は、遺伝子サンプル調製反応を行なうための装置形状の図示である。

図14は、複数の平行した反応を行なうための装置形状の図示である。

図15は、マイクロ加工されたポリカーボネート装置における統合された反応の例示である。図15Aは、前記装置の熱形状を包含する装置の配置を示す。図15Bは、前記装置のチャンバー内のPCR増幅及び続くインビトロ転写の結果を示す。  
発明の特定の記載

## I. 一般

ミニチュア化され、統合された核酸診断装置及びそれらの装置を組込むシステムを提供することが本発明の一般的な目的である。本発明の装置は一般に、1又は複数のサンプル分析操作と組み合わせて、1又は複数のサンプル獲得及び調製操作を行なうことができる。たとえば、前記装置は、単一のミニチュア化され、統合された単位内に、サンプル獲得及び貯蔵、サンプル調製及びサンプル分析に包含される操作のいくつか又はすべてを統合することができる。前記装置は、種々の用途、及び最とも著しくは、核酸基材の診断用途、及び新たには、配列決定用途に有用である。

本発明の装置は典型的には、装置からのデータを走査し、そして

得るためのリーダー装置、及び装置を調節し、そして装置に由来するデータを解釈するための、コンピューターに基づくインタフェースをさらに含む大きな診断システムの1つの成分であろう。

その主要機能を実施するためには、本発明の装置の1つの態様は典型的には、サンプル獲得、調製及び分析操作を実施するための多くの別個の反応チャンバーを組込むであろう。特に、分析されるべきサンプル装置中に導入され、それに基づいて、それは、サンプルの分析の前置きとして種々の反応を実施するよう企画されるそれらの別個の反応チャンバーの1つに供給される。それらの調製反応は一般的に、たとえば抽出、PCR増幅、核酸断片化及びラベリング、延長反応、転写反応及び同様のものを包含する。

サンプル調製に続いて、サンプルは1又は複数の異なった分析操作にゆだねられ得る。種々の分析操作、たとえば微小細管電気泳動を用いてのサイズに基づく分析、及び／又はオリゴヌクレオチドアレイに対するハイブリダイゼーションを

用いての配列に基づく分析が一般的に行なわれ得る。種々の反応チャンバーの他に、装置は一般的に、種々の反応チャンバー間に、サンプル又はその一部の輸送を可能にする一連の流体チャネルを含んで成る。さらなるチャンバー及び成分がまた、試薬、緩衝液、サンプル操作、たとえば混合、ポンピング、流体の方向づけ（すなわち、弁）、加熱、及び同様のものを提供するために包含され得る。

## II. 統合可能な操作

### A. サンプル獲得

本発明の装置のサンプル収集部分は一般的に、外部要素によりサンプルの汚染を妨げ、又はサンプルによる環境の汚染を妨げながら、サンプルの同定を付与する。一般的に、これは、分析のためのサンプル、たとえば予備増幅されたサンプル、組織、血液、唾液、等

を、装置内のサンプル収集チャンバー中に直接的に導入することによって行なわれる。典型的には、サンプルのクロス汚染の防止は、サンプルをサンプル収集チャンバー中に、封止できる開口部、たとえば注入弁又は隔膜を通して直接的に注入することによって達成され得る。一般的に、封止可能な弁は、サンプル注入の間、又はその後、漏れのいずれか可能性ある脅威を減じるために好ましい。他方では、装置は、その装置内に組込まれ、そしてサンプルチャンバー中へのサンプルの直接的な獲得のために、サンプル収集チャンバーに連結される皮下針を供給される。これは、サンプルの汚染の機会を実質的に減じることができる。

前記の他に、前記装置のサンプル収集部分はまた、感染性物質の中和、検体又はサンプルの安定化、pH調節及び同様のもののための試薬及び／又は処置を包含することができる。安定化及びpH調節処置は、血液サンプルの凝固を妨ぐためのヘパリンの導入、緩衝剤の添加、プロテアーゼ又はヌクレアーゼインヒビター、保存剤及び同様のものの添加を包含することができる。そのような試薬は一般的に、装置のサンプル収集チャンバー内に貯蔵され、又は別々接近できるチャンバー内に貯蔵され得、ここで試薬は、装置中へのサンプルの導入に基づいてサンプルに添加され、又はサンプルと共に混合され得る。それらの試薬は、使用される特定の試薬の性質及び安定性に依存して、液体又は凍結乾燥された形のいずれか

で装置内に組込まれ得る。

#### B. サンプル調製

装置中への分析されるべきサンプルの導入と、たとえば、オリゴヌクレオチドアレイに基づくそのサンプルの分析との間においては、サンプルに対して1又は複数のサンプル調製操作を行なうことがしばしば所望される。典型的には、それらのサンプル調製操作は、

完全な細胞のサンプル、ウイルス及び同様のものからの細胞内物質、たとえば核酸の抽出、核酸の増幅、断片化、転写、ラベリング及び／又は延長反応のような操作を包含するであろう。1又は複数のそれらの種々の操作が本発明の装置中に容易に組込まれ得る。

#### C. DNA 抽出

完全な細胞、ウイルス又は他の組織サンプルが分析される態様のためには、種々のサンプル調製操作を続けるに先立って、細胞又はウイルスから核酸を抽出することが典型的には必要であろう。従って、サンプル収集に続いて、収集された細胞、ウイルス被膜、等から核酸が粗抽出物に解放され、続いて、続く操作、たとえば汚染性(DNA結合)タンパク質の変性、精製、濾過、脱塩及び同様のもののためにサンプルを調製するための追加の処置が付随する。

サンプル細胞又はウイルスからの核酸の開放、及びDNA結合タンパク質の変性は一般的に、物理的又は化学的方法により行なわれ得る。たとえば、化学的方法は一般的に、細胞を破壊するために溶解剤を使用し、そして細胞から核酸を抽出し、続いて、その抽出物が、いずれかの汚染性の及び実質的に妨害性のタンパク質を変性するためにカオトロピック剤、たとえばグアニジウムイソチオシアネート又は尿素により処理される。一般的に、化学的抽出及び／又は変性が使用される場合、適切な試薬は、抽出チャンバー、別々の接近できるチャンバー内に導入され、又は外部的に導入され得る。

あるいは、核酸を抽出し、そしてDNA結合タンパク質を変性するために物理的方法が使用され得る。アメリカ特許第 5,304,487号(引用により本明細書に組込まれる)は、細胞膜を断片化し、そしてそれらの内容物を抽出するために、マイ

クロチャンネル内での物理的な突起物又は鋭いエッジを有する粒子の使用を論じている。攪拌のためへの圧電要素とそのような構造体との組合せは、溶解のための

適切な剪断力を提供することができる。そのような要素は、下記に核酸断片化に関して、より詳細に記載されている。

サンプルが十分な流れ圧力を有するチャンネルを通して通過される場合に細胞の溶解を引き起こす制限された横断面寸法を用いる、細胞抽出のより伝統的な方法もまた使用され得る。あるいは、細胞抽出及び汚染タンパク質の変性は、サンプルに交流電流を適用することによって実施される。より具体的には、細胞のサンプルが、微小管アレイを通して流され、ここで交流電流がその流体の流れを通して適用される。種々の他の方法、たとえば超音波攪拌に細胞をゆだねること、又は微小の幾何学的開口部を通して細胞を押し進めること、それにより破壊をもたらす高い剪断応力に細胞をゆだねることの方法が、細胞の溶解／抽出をもたらすために本発明の装置内に利用され得る。

抽出に続いて、粗抽出物の他の要素、たとえば変性されたタンパク質、細胞膜粒子、塩及び同様のものから核酸を分離することがしばしば、所望されるであろう。粒状物質の除去は一般的に、濾過、凝集又は同様のものにより達成される。種々のフィルタータイプが、装置中に容易に導入され得る。さらに、化学的変性方法が使用される場合、次の段階を進行せしめる前、サンプルを脱塩することが所望される。サンプルの脱塩、及び核酸の単離は、一般的に、単一の段階、たとえば固相に核酸を結合し、そして汚染性の塩を洗浄除去し、又はサンプルに対してゲル濾過クロマトグラフィーを行ない、透析膜に塩を通して、そして同様のことを行なうことによって実施され得る。核酸結合のための適切な固体支持体は、たとえば珪藻土、シリカ（たとえばガラスウール）、又は同様のものを包含する。当業界においてまた良く知られている適切なゲル排除媒体はまた、本発明の装置中に容易に組込まれ得、そしてたとえばPharmacia

及びSigma Chemicalから市販されている。

単離及び／又はゲル濾過／脱塩は、追加のチャンバーにおいて実施され得、又

は他方では、特定のクロマトグラフィー用媒体が、続く反応チャンバーに導びくチャンネル又は流体路に組込まれる。他方では、1又は複数の流体路又はチャンバーの内面自体が、所望する精製のために適切な官能基、たとえば荷電された基、親和性結合基及び同様のもの、すなわちmRNA精製のためのポリ-Tオリゴヌクレオチドを供給するよう誘導体化され得る。

あるいは、脱塩方法は一般的に、他の要素に比較してDNAの高い電気泳動移動度及び陰性を利用する。電気泳動方法はまた、他の細胞汚染物及び残骸からの核酸の精製に利用され得る。1つの例においては、装置の分離チャンネル又はチャンバーが、そこに配置される、電極たとえば白金電極を有する2つの別々の“現場(field)”チャンネル又はチャンバーに流体的に連結される。それらの2つの現場チャンネルは、核酸又は他の大きな分子の通過を可能にしないで、流れの通過を可能にする適切なバリヤー又は“捕獲膜”を用いて分離チャンネルから分離される。バリヤーは一般的に次の2つの基本的機能を有する：第1には、バリヤーは分離チャンバー内の正の電極に向かって移動する核酸を保持するよう作用し；そして第2には、バリヤーは電極での電解に関連する悪影響が反応チャンバー中に侵入しないよう（たとえば塩接合として作用しないよう）妨げる。そのようなバリヤーは、たとえば透析膜、濃いゲル、PEI フィルター又は他の適切な材料を包含する。適切な電場の適用に基づいて、サンプル中に存在する核酸は正の電極の方に移動し、そして捕獲膜上に取り込まれるようになる。次に、膜上に遊離したまま存続するサンプル不純物は、適切な流体の流れを適用することによってチャンバーから洗浄される。電圧を逆にするにより、核酸は、実質的に

純粋な形で膜から開放される。現場チャンネルは、分離チャンバー又はチャンネルの同じか又は反対側又は端上に配置され、そして最大の操作効率を確保するために、本明細書に記載される混合要素と共に使用され得る。さらに、目の荒いフィルターがまた、粒状物質、タンパク質又は核酸によるバリヤーのいずれかの目詰まりを回避するためにバリヤー上にオーバーレイされ得る。

類似する観点においては、負の電荷を有する核酸の高い電気泳動移動度が、より早い核酸の通過を可能にしながら、他の汚染物の流れを遅め又は阻止するであ

ろうゲル又は他の適切なマトリックスの短いカラムを用いることによって、汚染物から核酸を分離するために利用され得る。

多くの用途のために、細胞、細胞残骸及び他の汚染物からメッセンジャーRNAを抽出し、そして分離することが所望される。それ自体、本発明の装置は、多くの場合、mRNA精製チャンバー又はチャンネルを包含する。一般的に、そのような精製は、mRNA上のポリ-A端を利用する。特に、及び上記のように、ポリ-Tオリゴヌクレオチドは、mRNAのための親和性リガンドとして作用するよう装置のチャンバー又はチャンネル内に固定され得る。ポリ-Tオリゴヌクレオチドは、チャンバー又はチャンネル内に組込まれる固体支持体上に固定され、又は他方では、そのチャンバー又はチャンネル自体の表面上に固定され得る。チャンバー又はチャンネルの表面上へのオリゴヌクレオチドの固定化は、本明細書に記載される方法、たとえばその表面の酸化及びシラン化、続くオリゴヌクレオチドの標準のDMT合成により行なわれ得る。

操作においては、溶解されたサンプルが、ハイブリダイゼーションのためのイオン強度を高めるために高い塩溶液でこのチャンバー又はチャンネル中に導入され、これに基づいて、mRNAが固定されたポ

リ-Tにハイブリダイズするであろう。ハイブリダイゼーションはまた、本明細書に記載されるように、混合要素の組込みを通して増強され得る。ハイブリダイゼーションのために十分な時間の経過の後、チャンバー又はチャンネルはきれいな塩溶液により洗浄される。次に、固定されたポリ-Tオリゴヌクレオチドに結合されたmRNAが、低いイオン強度の緩衝液において洗浄される。ポリ-Tオリゴヌクレオチドが固定されるその表面積は、チャンバー又はチャンネル内にエッチングされた構造体、たとえば隆起物、溝のある物、又は同様のものの使用により高められ得る。そのような構造体はまた、本明細書に記載されるように、チャンバー又はチャンネルの内容物の攪拌も助ける。他方、ポリ-Tオリゴヌクレオチドは、多孔性表面、たとえば多孔性珪素、ゼオライト、シリカキセロゲル、焼結された粒子、又は他の固体支持体上に固定され得る。

#### D. 増幅及びインビトロ転写



サンプル収集及び核酸抽出に続いて、サンプルの核酸部分が、典型的には1又は複数の調製反応にゆだねられる。それらの調製反応は、インビトロ転写、ラベリング、断片化、増幅及び他の反応を包含する。核酸増幅は、興味ある標的核酸配列のコピー数を高める。種々の増幅方法が、本発明の方法及び装置、たとえばポリメラーゼ連鎖反応方法又は(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、自立した配列複製(3SR)、及び核酸基材の配列増幅(NASBA)への使用のために適切である。

後者の2つの増幅方法は、等温転写に基づく等温反応を包含し、この方法は、それぞれ約30又は100:1の比で増幅生成物として一本鎖RNA(ssRNA):二本鎖DNA(dsDNA)を生成する。結果として、それらの後者の方法が使用される場合、配列分析がDNA又はRNAのいずれかに対して相補的ないずれかのタイプの基質を用いて実施さ

れ得る。

特に好ましい観点においては、増幅段階は、当業界において良く知られているPCR技法を用いて実施される。PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T., eds.) Academic Press(1990)(引用により本明細書に組込まれる)を参照のこと。PCR増幅は一般的に、標的核酸配列に対する多数の相補体を生成するための鋳型としてその配列の1つの鎖の使用を包含する。一般的に、標的配列の相補的鎖のセグメントの異なった端に対して相補的な2つのプライマー配列が、標的配列のそれらのそれぞれの鎖とハイブリダイズし、そしてポリメラーゼ酵素及びヌクレオシド三リン酸の存在下で、プライマーが標的配列にそって延長される。その延長物が標的配列から溶解され、そしてその工程が反復され、そして標的配列の追加のコピーが前記段階において合成される。PCR増幅は典型的には、標的核酸の十分な量を生成するために、変性、ハイブリダイゼーション及び延長反応の反復されたサイクルを包含する。PCRの個々のサイクルの最初の段階は、プライマー延長により形成される核酸重複体の分離を包含する。鎖が分離された後すぐに、PCRにおける次の段階は、標的配列を両端に有するプライマーによる前記分離された鎖のハイブリダイゼーションを包含する。次に、プライマーが延長され、標的鎖の相補的

コピーが形成される。好結果をもたらすPCR増幅のためには、個々のプライマーが重複体にそってハイブリダイズする位置が、1つのプライマーから合成される延長生成物が、鋳型（相補体）から分離される場合、他のプライマーの拡張のための鋳型として作用するような位置であるプライマーが企画される。変性、ハイブリダイゼーション及び延長のサイクルが、所望する量の増幅された核酸を得るために必要なほど反復される。

PCR法においては、鎖の分離は、通常、デュプレックスの変性を引き起こすが、しかしポリメラーゼ酵素の非可逆性変性を引き起こさないような十分な時間、十分に強い温度に反応を加熱することによって達成される（アメリカ特許第4,965,188号を参照のこと；これは引用により本明細書に組込まれる）。典型的な熱変性は、数秒～数分間の範囲の時間、約80℃～105℃の範囲の温度を包含する。しかしながら、鎖の分離は、物理的、化学的又は酵素的手段を包含するいずれか適切な変性法により達成され得る。鎖の分離は、ヘリカーゼ、又はヘリカーゼ活性を示すことができる酵素により誘発され得る。たとえば、酵素RecAはATPの存在下でヘリカーゼ活性を有する。ヘリカーゼによる鎖の分離のために適切な反応条件は当業界において知られている（Kuhn Hoffman-Berling, 1978, CSH-Quantitative Biology, 43: 63-67; 及びRadding, 1982, Ann. Rev. Genetics 16: 5-436（個々は、引用により本明細書に組込まれる）を参照のこと）。他の態様によれば、サンプルを通しての電場の適用により鎖の分離が達成される。たとえば、公開されたPCT出願番号WO92/04470及びWO95/25177（引用により本明細書に組込まれる）は、DNAを含むサンプルへの電場の適用により二本鎖DNAを変性する電気化学的方法を記載する。この電気化学的変性を実施するための構造体は、反応チャンバーを通して電位安定配置で配列される、作動電極、カウンター電極及び対照電極を包含する（公開されたPCR出願番号WO92/04470及びWO95/25177を参照のこと；それらは引用により本明細書に組込まれる）。そのような装置は、本明細書に記載される微小加工技法を用いて本発明の装置中への組込みのために容易にミニチュア化され得る。

PCRにおけるプライマーの鋳型一依存性延長は、適切な塩、金属カチオン及び

pH緩衝システムを含んで成る反応媒体における少なく

とも4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸（典型的には、dATP, dGTP, dCTP, dUTP及びdTTPから選択される）の適切な量の存在下で、重合剤により触媒される。反応成分及び条件は、当業界において良く知られている（PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications (Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T., eds.) Academic Press (1990) を参照のこと；引用により本明細書に組込まれる）。適切な重合剤は、鋳型－依存性DNA合成を触媒することが知られている酵素である。

公開されたPCT 出願番号WO94/05414 (Northrup and White) は、PCR 反応の間、熱循環及び混合においてマイクロヒーター及びマイクロポンプを組込むmicro PCR チャンバーの使用を論じている。

装置の増幅反応チャンバーは、種々の増幅試薬の添加のための封止可能な開口部を含んで成る。しかしながら、好ましい観点においては、増幅チャンバーは、増幅チャンバー内に、又は関連する試薬チャンバー内に予備配置された上記種々の増幅試薬の有効量を有し、それにより、前記試薬は増幅操作の開始に基づいて増幅チャンバーに容易に輸送され得る。“有効量”とは、標的化された核酸配列の増幅を実施するために必要とされる試薬の量及び／又は濃度を意味する。それらの量は、既知のPCR プロトコールから容易に決定される。たとえば、Sambrook, など., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, (2nd ed.) Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)及びPCR Protocols : A Guide to Methods and Applications (Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. and White, T., eds.) Academic Press(1990)(これらは、引用により本明細書に組込まれる)を参照のこと。種々の試薬が増幅又は隣接チャンバー内に予備配置されているそれらの態様のためには、全体の装置の最大の貯蔵寿命を付与するために、それらの試薬は凍結乾燥された形で

存在することがしばしば所望されるであろう。次に、そのチャンバーへの液体サンプルの導入が、試薬を活性形で再構成し、そして特定の反応が実施され得る。

いくつかの観点においては、ポリメラーゼ酵素が増幅チャンバー内に存在し、適切な固体支持体又は増幅チャンバーの壁及び表面に結合され得る。適切な固体支持体は、当業界において良く知られているもの、例えばアガロース、セルロース、シリカ、ジビニルベンゼン、ポリスチレン、等を包含する。固体支持体への酵素の結合は、酵素活性の実質的な損失を伴わないで、及び酵素を凍結乾燥する必要性を伴わないで、数日、数週間又は数カ月間の貯蔵を可能にする、問題の酵素の安定性を付与することが報告されている。サーマス・アクアチカス (*Thermus aquaticus*) からの94kdの単一のサブユニット DNAポリメラーゼ (又はtaq ポリメラーゼ) は、本発明に使用されるPCR 基材の増幅方法のために特に適切であり、そして一般的に、例えばPromega, Inc., Madison, WIから入手できる。特に、そのポリメラーゼ活性に影響を及ぼさないで酵素を結合するモノクローナル抗体が入手できる。結果的に、固体支持体、又は増幅チャンバーの壁への活性ポリメラーゼ酵素の共有結合は、酵素と支持体との間にリンカーとして抗体を用いることによって実施され得る。

RCR 及びIVT 反応の他に、本発明の方法及び装置はまた、多くの他の反応型、たとえば逆転写、ニックトランスレーション、及び同様のものにも適用できる。

#### E. ラベリング及び断片化

サンプル中の核酸は一般的に、続く段階での検出を促進するためにラベルされる。ラベリングは、増幅、インビトロ転写、又はニックトランスレーション工程の間に実施され得る。また、増幅、イン

ビトロ転写又はニックトランスレーションは、ラベルされたプライマーの使用、又は増幅された配列中へのラベルされたdNTPの組込みのいずれかを通して、増幅された又は転写された配列中にラベルを組込むことができる。

あるいは、サンプル中の核酸は、増幅に続いてラベルされ得る。後増幅ラベリングは典型的には、増幅された配列に対する特定の検出可能基の共有結合を包含する。適切なラベル又は放射性ラベリング基は当業界において良く知られている。それらのラベルはまた、当業界において良く知られている方法を用いて、配列に結合され得る。たとえば、Sambrookなどを参照のこと。

さらに、増幅された配列は、他の後増幅処理にゆだねられ得る。たとえば、多くの場合、ルーピング及び／又は複数のプローブへのハイブリダイゼーションを回避する、プローブにより容易に接近可能であるセグメントを供給するために、オリゴヌクレオチドアレイによるハイブリダイゼーションの前、配列を断片化することが所望される。核酸の断片化は一般的に、当業界において知られている、物理的、化学的又は酵素的方法により実施され得る。それらの追加の処置は、増幅チャンバー内で行なわれ、又は他方では、別のチャンバーにおいて実施され得る。たとえば、物理的断片化法は、核酸を含むサンプルを、反応チャンバー又は流体チャネルの表面のピット又はスパイク上を移動せしめることを包含する。その表面の不規則と組合してのその流体サンプルの移動は、高い剪断速度を生成し、核酸の断片化をもたらす。1つの観点においては、これは、圧電要素、たとえばPZT セラミック要素を、本明細書に記載されるようにして、反応チャンバー又は流れチャネルを被覆する支持体層に隣接して、直接的に又は液体層を通して配置することによって、ミニチュア装置において達成され得る。支持体層は、チャンバー又は流

れチャネル内に存在する、その表面において製造されるピット、スパイク又は開口部を有する。厚さモードでPZT 要素を駆動することによって、起立した状態の波がチャンバー内にひき起こされる。チャンバー内のキャビテーション及び／又は流れが実質的な剪断をもたらす。類似する剪断速度が、制限されたサイズの流れ通路、たとえばミクロン又はサブミクロン規模での横断面寸法を有する開口部を通して、核酸含有流体サンプルを押し進めることによって達成され、それにより、高い剪断速度を生成し、そして核酸を断片化する。

多くのサンプル調製操作が、サンプル、たとえば細胞溶解、核酸断片化、酵素変性及び同様のもののpHを調節することによって実施され得る。同様に、pH調節はまた、装置において実施される広範囲の種類他の反応において、すなわち反応条件を最適化し、酸又は塩基添加により中和し、外因的に導入された酵素を変性し、反応を停止し、そして同様のことをするために役割を演じることができる。そのようなpHモニター及び調節は、良くしられた方法を用いて容易に達成され

得る。たとえば、pHは、特定のチャンバー内にpHセンサー又はインジケーターを導入することによりモニターされ得る。次に、調節は、適切な酸又は塩基によりチャンバー内容物を滴定することにより実施され得る。

他の観点においては、装置は電氣的に調節されたpHシステムを包含することができる。操作においては、電極が反応チャンバーに隣接して、たとえば流体接触して配置され、そしてカウンター電極が第2チャンバー又は第一チャンバーに流体連絡されるチャンネル内に配置される。それらの電極への電流の適用に基づいて、反応チャンバーのpHは、電極の表面での水の電気分解（ $O_2$ 及び水素を生成する）により変えられる。pHセンサーはまた、チャンバー内の正確な

pHのモニターリング及び／又はフィードバック調節を付与するために反応チャンバー内に包含され得る。

電氣的pH調節システムを用いる反応チャンバーの1つの例は、図11に示される。示されるように、2つの平面膜1102及び1104から加工された装置1100は、3種の異なったチャンバー、すなわち対照チャンバー1106、反対チャンバー1108及びカウンター電極チャンバー1110を包含する。対照チャンバー1106及びカウンター電極チャンバー1110の個々は、流体通路1112及び1114を通して反応チャンバー1108に流体的に連結される。それらの通路は典型的には、適切なバリヤー1116、たとえば透析膜、ゲルプラグ又は同様のものにより、チャンバー間のサンプル要素の電気泳動通過を防ぐためにブロックされる。対照チャンバー1106は典型的には、対照電極1118を包含する。その対照電極は、たとえば、テフロン及び白金ブラックの混合物により圧縮された、白金、金又はニッケルスクリーンから加工され得る（水素電極を生成する）。反応チャンバー1108は典型的には、電気分解電極1120、たとえば適切なバリヤー、たとえばポリアクリルアミドゲル層により被覆された、白金、金又はニッケルスクリーン、及びまた適切なバリヤーにより保護されている水素電極1122を包含する。対照電極1118及び水素電極1122は、反応チャンバー内のpHをモニターするために電気測定器1126に連結される。カウンター電極チャンバー1110は典型的には、カウンター電極1123、たとえば単一の白金、金又はニッケルスクリーン電極を包含する。電気分解電極及びカウンター電極は

、適切な電流路1124に連結される。

サンプル、たとえば細胞懸濁液又は核酸含有サンプルの導入に基づいて、電流が電流源から適用される。電気分解電極での電気分解は、反応チャンバー1108内のpHを変える。電気測定器は、対照電極と水素電極との間の電圧により検知されるpHを比較する。このシグ

ナルは、適切な手段、たとえば適切にプログラムされたコンピューター又は他のマイクロプロセッサ1128により整定値に比較され得、そして電流の適用を調節するために使用され得る。この得られるシステムは、整定値シグナルを変えることによって、反応チャンバー内のpHの自動調節を可能にする。

#### F. サンプル分析

種々のサンプル調製操作に続いて、サンプルは一般的に、1又は複数の分析操作にゆだねられるであろう。特に好ましい分析操作は、たとえばオリゴヌクレオチドアレイを用いての、配列に基づく分析、及び/又はたとえば微小細管アレイ電気泳動を用いての、サイズに基づく分析を包含する。

##### 1. オリゴヌクレオチドプローブアレイ

1つの観点においては、サンプル調製に続いて、核酸サンプルが、オリゴヌクレオチドプローブアレイを用いてプローブされる。オリゴヌクレオチドアレイは一般的に、支持体に結合される多数の位置的に明確なオリゴヌクレオチドプローブを有する支持体を包含する。“Genechip™アレイ”としてまた記載されるそれらのオリゴヌクレオチドアレイは一般的に、たとえばアメリカ特許第5,143,854号及びPCT 特許出願番号WO90/15070及び92/10092に記載されている。それらの先駆アレイは、写真平版法及び固相オリゴヌクレオチド合成法の組合せを組込む、機械的又は光方向づけされた合成法を用いて生成され得る。Fodor など., Science, 251 : 767-777 (1991), Pirrung など., アメリカ特許第5,143,854号(また、PCT 出願番号WO90/15070も参照のこと) 及びFodor など., PCT公開番号WO92/10092(それらすべては、引用により本明細書に組込まれる)を参照のこと。それらの文献は、たとえば光方向づけられた合成技法を用いて、ペプチド、オリゴヌクレオチド及び他のポリマー配列の漠

大なアレイを形成する方法を開示する。機械的合成方策を用いてのそれらのアレイの合成のための技法は、たとえばPCT 公開番号93/09668及びアメリカ特許第 5,384,261号（それらは引用により本明細書に組込まれる）に記載されている。射出成形されたポリマーケーシングへのそれらのアレイの組込みは、公開されたPCT 出願番号95/33846に記載されている。

オリゴヌクレオチドアレイの光方向づけされた合成のための基本的な方策は、次の通りである。感光性保護基により変性された固体支持体の表面を写真平版マスクを通して照射し、その照射された領域に反応性ヒドロキシル基を生成する。典型的には、3'-O-ホスホラミジットー活性化されたデオキシヌクレオシド（感光性保護基によりその5' ヒドロキシルで保護されている）の形でその選択されたヌクレオチドが、表面に表わされ、そしてカップリングが光に照射される部位で生じる。キャッピング及び酸化に続いて、支持体をすすぎ、そしてその表面を第2のマスクを通して照射し、カップリングのために追加のヒドロキシル基を暴露する。第2の選択されたヌクレオチド（たとえば、5'-保護された、3'-O-ホスホラミジットー活性化されたデオキシヌクレオシド）がその表面に表わされる。それらの選択保護解除及びカップリングサイクルが、所望する組の生成物が得られるまで反復される。写真平版が使用されるので、その工程は、オリゴヌクレオチドプローブの高密度アレイを生成するために容易にミニチュア化され得る。さらに、個々の部位でのオリゴヌクレオチドの配列は知られている。Pease など、（機械的合成法は、合成段階における保護解除及び添加のための流体の機械的方向づけを包含することを除いて、光方向づけされた方法に類似する）を参照のこと。

典型的には、本発明に使用されるアレイは、1 cm<sup>2</sup> 当たり 100 以

上の異なったプローブの部位密度を有するであろう。好ましくは、アレイは、500/cm<sup>2</sup> 以上、より好ましくは約1000/cm<sup>2</sup> 以上、及び最とも好ましくは約10,000/cm<sup>2</sup> 以上の部位密度を有するであろう。好ましくは、アレイは、単一の支持体上に100 以上の異なったプローブ、より好ましくは約1000以上の異なったプローブ、さらにより好ましくは、約10,000以上の異なったプローブ及び最とも好まし



くは100,000以上の異なったプローブを有するであろう。

いくつかの態様のために、一定の長さのすべての可能なプローブを有するオリゴヌクレオチドアレイが調製され得る。そのようなアレイは、従来の方法よりも実質的な利点を提供する、配列決定用途又は配列を調べる用途のような分野において使用され得る。そのような用途へのオリゴヌクレオチドアレイの使用は、たとえば、1995年7月24日に出願されたアメリカ特許出願番号08/515,919、及び1994年8月2日に出願されたアメリカ特許出願番号08/284,064（これらは引用により本明細書に組込まれる）に記載されている。それらの方法は典型的には、DNAの長い方の標的鎖に基づいて相補的配列を調べるために、定義された配列の短い一組のオリゴヌクレオチドプローブを使用する。アレイ上の標的配列のハイブリダイゼーションパターンが、標的DNA配列を再構成するために使用される。多数のプローブのハイブリダイゼーション分析は、DNAの長い延長部を配列決定するために使用され得る。

新規配列決定の1つの方策は、次の例により示され得る。ローマーの標的DNA配列が、完全な組のオクタヌクレオチドプローブを有するアレイに基づいてプローブされる。65,536のオクタマープローブのうち5つは、好ましくは、標的配列に対してハイブリダイズするであろう。個々の部位でのプローブの同一性は知られている。従って、標的がアレイ上でハイブリダイズする位置、又はハイブリダイ

ゼーションパターンを決定することによって、標的配列の配列を決定することができる。それらの方策はいくつかの用途において提案され、そして利用されて来たが、それらの同じ方策を用いて、より大きな核酸の配列決定を示すことには困難性があった。従って、好ましい態様においては、本明細書に記載される装置を用いるSBH方法は、アメリカ特許出願番号08/505,919（引用により本明細書に組込まれる）に記載されるように、有用な配列データを供給するためには、ミスマッチされたプローブ及び好ましくは、ミスマッチするプローブからのデータを使用する。

長さ $n$ のあらゆる可能な配列を有するオリゴヌクレオチドプローブが調製され得るが、特定の核酸配列に対して特異的であり且つ相補的であるオリゴヌクレオ

チドアレイを供給することが、本発明を実施する上でしばしば所望されるであろう。たとえば、特に好ましい観点においては、オリゴヌクレオチドアレイは、特定の標的配列、及びそれらの個々の又は複数の突然変異に対して相補的であるオリゴヌクレオチドプローブを含むであろう。そのようなアレイは、特定の核酸配列の存在により特徴づけられる特定の疾病の診断において特に有用である。たとえば、標的配列は、外因性の疾病を引き起こす物質、たとえばヒト免疫欠損ウイルスの配列であり得（アメリカ特許出願番号08/284,064を参照のこと；引用により本明細書に組込まれる）、又は他方では、標的配列は、特定の障害、すなわち鎌状赤血球貧血（たとえば、引用により本明細書に組込まれるアメリカ特許出願番号08/082,937を参照のこと）、又はノウ胞性線維症の場合、突然変異誘発されることが知られているヒトゲノムの配列部分であり得る。

そのような用途において、アレイは一般的に、長さ約9～約21のヌクレオチドから成る少なくとも4組のオリゴヌクレオチドプロー

ブを含んで成る。第1のプローブ組は、標的配列において個々のヌクレオチドに対応するプローブを有する。プローブは、その対応するヌクレオチドを含む標的配列のサブ配列に対して正確に相補的であることにより、その対応するヌクレオチドに関連している。従って、個々のプローブは、標的配列におけるその対応するヌクレオチドに対する相補的ヌクレオチドにより占有される、疑問位置 (interrogation position) と称する位置を有する。3個の追加のプローブ組は、第1のプローブ組における個々のプローブのための対応するプローブを個々に有するが、しかし3個の他のヌクレオチドによりその疑問位置で置換されている。従って、標的配列における個々のヌクレオチドに関しては、4個の対応するプローブ、すなわちプローブ組の個々から1つのプローブが存在する。3個の追加のプローブ組における3個の対応するプローブは、第1のプローブからのその対応するプローブ、又は疑問位置を含むそのサブ配列と同一であるが、但し前記疑問位置は4個の対応するプローブの個々における異なったヌクレオチドにより占有されている。

いくつかのアレイは、第5、第6、第7及び第8番目のプローブ組を有する。

個々の組におけるプローブは、第1の4個のプローブ組におけるプローブについての原理に類似する原理により選定されるが、但し、前記第5、第6、第7及び第8番目のプローブ組におけるプローブは、第2の対照配列に対する相補正を示す。いくつかのアレイにおいては、第1組のプローブは標的配列のコード鎖に対して相補的であり、そして第2組のプローブは、非コード鎖に対して相補的である。他方、第2の対照配列は、少なくとも1つのヌクレオチドの置換を有する第1の対照配列のサブ配列であり得る。

いくつかの用途においては、標的配列は少なくとも1つの決定されていない位置におけるプローブ配列に対しての置換されたヌクレ

オチドを有し、そしてプローブの相対的特異的結合は、標的配列における前記決定されていない位置の位置決定及び前記位置を占有するヌクレオチドを示す。

増幅及び／又はラベリングに続いて、核酸サンプルは、ハイブリダイゼーションチャンバーにおいてオリゴヌクレオチドアレイと共にインキュベートされる。サンプルの核酸配列とアレイ上のオリゴヌクレオチドプローブとの間のハイブリダイゼーションが次に、たとえば蛍光間共焦顕微鏡 (epifluorescence confocal microscopy) を用いて検出される。典型的には、サンプルは、アレイ上の核酸プローブに対するサンプルにおける核酸のハイブリダイゼーションを増強するために、ハイブリダイゼーションの間に混合される。再び、混合は、本明細書に記載される方法、たとえば圧電要素の使用を通して、電気泳動法により、又はハイブリダイゼーションチャンバー中に又はそれから、すなわち隣接するチャンバー中に流体をポンプで送ることによっての物理的混合により実施され得る。一般的に、検出操作は、診断装置の外部の読取り装置を用いて行なわれるであろう。しかしながら、診断装置自体にデータ収集操作を組込むことが、多くの場合、所望される。

次に、ハイブリダイゼーションデータは分析され、サンプル内の特定の配列の存在又は不在が決定され、又は複数のハイブリダイゼーションを分析することにより、標的核酸の配列がすでに記載されたSBH 技法を用いて決定される。

幾つかの場合、ハイブリッドされたオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼー

ションに続いてラベルされ得る。たとえば、ビオチンによりラベルされたdNTPが、たとえば増幅又は転写に使用される場合、ストレプトタビジン結合のレポーター基がハイブリダイズされた複合体をラベルするために使用され得る。そのような操作は、本発

明のシステム中に容易に組込まれ得る。

## 2. 細管電気泳動

多くの態様においては、サンプルからの核酸を分析するための追加の又は他の手段を提供することが所望される。1つの態様においては、本発明の装置は、任意に又はさらに、サンプルから得られた核酸の分析のための微小細管アレイを含んで成る。

微小細管アレイ電気泳動は一般的に、特定の分離媒体により充填されても又はされなくても良い薄細管又はチャネルの使用を包含する。その細管を通してのサンプルの電気泳動は、サンプルのための、サイズに基づく分離プロフィールを提供する。核酸のサイズ分離への微小細管電気泳動の使用はたとえば、Wooley and Mathies, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA (1994) 91 : 11348-11352 に報告されている。微小細管アレイ電気泳動は一般的に、サイズに基づく配列決定、PCR 生成物分析及び制限フラグメントの分離のための急速な方法を提供する。それらの細管の高い表面：体積の比は、細管を通しての実質的な熱変動を伴わないで、細管を通して高い電場の適用を可能にし、結果的に、より急速な分離を可能にする。さらに、共焦イメージング法と組合される場合、それらの方法は、放射性配列決定法の感度に比較できる、アトモルの範囲での感度を提供する。

微小細管電気泳動装置を包含するマイクロ流体装置のマイクロ加工は、次の文献に詳細に論じられている：たとえば、Jacobsen、など., Anal. Chem. (1994) 66 : 1114-1118, Effenhauser、など., Anal. Chem. (1994) 66 : 2949-2953, Harrison、など., Science (1993) 261 : 895-897, Effenhauser、など., Anal. Chem. (1993) 65 : 2637-2642、及びManz、など., J. Chromatog. (1992) 593 : 253-258。典型的には、それらの方法は、シリカ、珪素又は他の硬質の支持体又はチップ上へのマイクロ規模のチャネルの写真平版

エッチングを含んで成り、そして本発明のミニチュア化された装置への使用のために容易に適合され得る。いくつかの態様において、細管アレイは、本明細書に記載される射出成形技法を用いて、装置の本体の加工のために記載される同じポリマー材料から加工され得る。そのような場合、細管及び他の流体チャネルは、第1の平面要素中に成形され得る。それを通して配置される細管チャネルの末端に対応する口を有する第2の薄ポリマーメンバーが、それらのチャネルの上面を供給するために前記第1の要素上に積層され又は音波溶接される。電気泳動調節のための電極が、細管チャネルへの電流の適用のためにそれらの口／ウェル内に配置される。細管チャネルの被覆メンバーとしてのこのシートの相対的な使用を通して、電気泳動の間に生成される熱が急速に散逸され得る。さらに、細管チャネルは、より熱伝導性の材料、たとえばガラス又はセラミックにより被覆され、熱散逸を増強される。

多くの細管電気泳動法においては、平面支持体中にエッチングされ、機械処理され、又は溶接された融合シリカ細管又はチャネルが、適切な分離用／篩分け用マトリックスにより充填されている。典型的には、種々の篩分け用マトリックスが当業界において知られており、そして微小細管アレイに使用され得る。そのようなマトリックスの例は、たとえばヒドロキシエチルセルロース、ポリアクリルアミド、アガロース及び同様のものを包含する。ゲルマトリックスは、細管チャネル内に導入され、そして重合され得る。しかしながら、多くの場合、これはサンプル分離を妨害するチャネル内の泡の取り込みをもたらす。従って、細管部分の平面要素を整合する前、細管チャネル内に予備形成された分離用マトリックスを配置することがしばしば所望される。たとえば音波溶接を通しての2つの部分の固定は、チャネル内にマトリックスを永久的に固定する。チャネ

ル外での重合は、泡の非形成を助ける。さらに、溶接工程の圧力は、ボイドのないシステムの確保を助ける。一般的に、特定のゲルマトリックス、使用緩衝液及び運転条件は、特定の用途の分離特徴、たとえば核酸フラグメントのサイズ、必要とされる分離、及び生来の又は変性されていない核酸分子の存在を最大にするよう選択される。たとえば、使用緩衝液は、サンプル中の核酸を変性するために

、変性剤、カオトロピック剤、たとえば尿素、又は同様のものを包含する。

核酸の“フィンガープリント”分析及び他のサイズに基づく分析への使用の他に、細管アレイはまた、配列決定用途にも使用され得る。特に、ゲルに基づく配列決定技法は、細管アレイ電気泳動のために容易に適合され得る。たとえば、細管電気泳動は、Sambrookなど、（また、Brenner、など、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (1989) 86 : 8902-8906を参照のこと）に論じられるようなSangerジデオキシ鎖終結配列決定法と組合され得る。それらの方法においては、サンプルの核酸が拡張反応において蛍光ジデオキシヌクレオシド三リン酸の存在下で増幅される。ジデオキシヌクレオチドのランダムな組込みが、核酸の転写を停止せしめる。これが、単一の塩基で他のメンバーとは異なる広範囲の転写生成物をもたらす。次に、サイズに基づく比較分離が、組込まれるべき最後のジデオキシヌクレオチドに基づいての核酸の配列の決定を可能にする。

#### G. データ収集及び分析

種々の分析操作、たとえばオリゴヌクレオチド及び／又は微小細管アレイからのデータの収集は典型的には、当業界において知られている方法を用いて実施されるであろう。たとえば、前記アレイが、ブローブアレイの領域にハイブリダイズする蛍光的にラベルされた標的を励起するためにレーザーを用いて走査され、次に前記標的

はアレイの広分野の走査のために荷電された連結装置（“CCD”）を用いて映像化され得る。他方、アレイからデータを収集するためのもう1つの特に有用な方法は、高い解像度の検出性と共に容易に自動化される工程の容易さ及び速度を兼ね備えるレーザー共焦顕微鏡の使用を通してである。特に好ましい走査装置は一般的に、アメリカ特許第 5,143,854号及び第 5,424,186号に記載されている。

データ収集操作に続いて、データは典型的には、データ分析操作に伝達されるであろう。サンプル分析操作を促進するためには、装置からリーダーにより得られるデータは典型的には、デジタルコンピューターを用いて分析されるであろう。典型的には、そのコンピューターは、装置からのデータの受領及び貯蔵のために、及び収集されたデータの分析及び報告のために、すなわちたとえば1994年10

月21日に出願されたアメリカ特許出願番号08/327,525（引用により本明細書に組込まれる）に記載されるように、ハイブリダイズするプローブの配列を決定するための蛍光データの解釈、バックグラウンド及び単一塩基ミスマッチハイブリダイゼーションの標準化、SBH 用途における配列データの指図、及び同様のことのために適切にプログラムされるであろう。

### III. 核酸診断システム

#### A. 分析システム

本発明の装置に基づく代表的な分析システムの略図は、図1に示される。システムは、たとえばハイブリダイゼーション及び／又はサイズに基づく分離を用いて、サンプル収集、調製及び／又は分析の1又は複数の操作を行なう診断装置2を包含する。次に、前記診断装置が、装置上に存在するハイブリダイゼーション及び／又は分離情報を検出するためにリーダー装置4に配置される。次に、そのハイブリダイゼーション及び／又は分離データは、リーダー装置が

ら、診断装置からのリーダー装置により得られたデータを解釈するための適切なソフトウェアによりプログラムされたコンピューター6に報告される。診断装置からのデータの解釈は、種々の手段、たとえば特定の疾病原因物質、たとえばウイルス又は細菌感染、AIDS、マラリア、等、又は遺伝子障害、たとえば鎌形赤血球貧血、ノウ胞性線維症、ぜい弱X症候群、Duchenne筋ジストロフィー、及び同様のものに対して向けられる核酸配列決定に使用され得る。他方、前記装置は、これまで知られていない配列の核酸配列を同定するために新規配列決定用途に使用され得る。

#### B. 診断装置

##### 1. 一般

上記のように、本発明の装置は一般的に、サンプルに対して多くの調製及び分析反応を実施することができる。この目的を達成するためには、装置は一般的に、単一の単位又は本体内に配置される、多くの別々の反応、貯蔵及び／又は分析チャンバーを含んで成る。“診断装置”として本明細書において言及される場合、本発明の装置は、診断の範囲外の種々の用途を有するであろうことを、当業者

は理解するであろう。そのような用途は、配列決定用途、サンプル用途及び特徴化用途（たとえば、分類学的研究、法的な適用、すなわち犯罪調査、及び同様のもののための）を包含する。

典型的には、装置の本体は、上記操作が実施される、種々のチャンバー及び流体通路を定義する。本体の加工、及び従って、本体内に配置される種々のチャンバー及びチャンネルの加工は一般的に、種々の良く知られた製造技法及び材料の1又は組合せを用いて実施され得る。一般的に、本体が加工される材料は、装置が暴露される十分な範囲の条件、たとえば極端な温度、塩、pH、電場の適用及び同様のものに対して最大の耐性を付与するよう選択され、そしてまた

、装置に使用される他の材料との適合性のために選択されるであろう。追加の成分は、必要なら、本体中に、後で導入され得る。他方、装置は、後でアSEMBルされ、又は嵌め合される多くの別々の部分から形成され得る。たとえば、別々の及び個々のチャンバー及び流体通路は、装置の種々のチャンバーを供給するためにアSEMBルされ得る。

ミニチュア化された装置の場合、装置の本体は典型的には、約1~20cm×約1×10cm×約0.1~2cm（長さ×幅×厚さ）であろう。長方形状を示すけれども、本発明の装置は、特定の必要性に依存していづれの形状においても具体化され得ることが容易に理解されるであろう。さらに、それらの寸法は典型的には、装置により実施される操作の数、それらの操作の複雑性及び同様のものにひじょうに依存するであろう。結果として、それらの寸法は、装置の一般的な表示として提供される。装置内に含まれる反応チャンバーの数及びサイズはまた、装置が使用されるべき特定の用途にひじょうに依存するであろう。一般的に、装置は少なくとも2つの別個の反応チャンバー、及び好ましくは、少なくとも3、4又は5の別個の反応チャンバーを含み、それらのすべては単一の本体内に組込まれる。個々の反応チャンバーはまた、その反応チャンバーの特定の機能に従って、サイズ及び形状で変化するであろう。たとえば、多くの場合、環状反応チャンバーが使用され得る。他方では、細長い反応チャンバーが使用され得る。しかしながら、一般的には、反応チャンバーは、約0.05~約20mmの幅又は直径、好ましくは約0



.1又は0.5～約20mmの幅又は直径、及び約0.05～約5mmの深さ及び好ましくは0.05～約1mmの深さのものであろう。細長いチャンバーに関しては、長さはまた典型的には、それらの同じ範囲にそって変化するであろう。他方、流体チャネルは典型的には、チャンバーに対してより小

さな寸法を有することにおいてチャンバーとは区別され、そして典型的には、約1～約1000 $\mu$ mの幅、好ましくは100～500 $\mu$ mの幅及び約1～500 $\mu$ mの深さの範囲であろう。反応チャンバーに関して記載されているが、それらのチャンバーは、多くの変更された機能、たとえば貯蔵チャンバー、インキュベーションチャンバー、混合チャンバー及び同様のものとして実施することができることは理解されるであろう。

多くの場合、別のチャンバーが、続く反応チャンバー中への導入のために流体体積を正確に測定するために、容積測定チャンバーとして使用され得る。そのような場合、チャンバーの体積は、与えられた反応の容積測定の必要性により指図されるであろう。さらに、装置は、種々であるが、しかし既知である体積又は体積比（たとえば、反応チャンバー又は他の容積測定チャンバーに比較して）を有する広範囲の容積測定チャンバーを含むように加工され得る。

上記のように、装置の本体は一般的に、マイクロ加工技法のために適切な種々の方法及び材料を用いて加工される。たとえば、好ましい観点においては、装置の本体は、個々に、種々のポリマー材料から加工された射出成形品であり得る多くの平面メンバーを含んで成り、又は珪素、ガラス、又は同様のものであり得る。シリカ、ガラス、又は珪素のような支持体の場合、エッチング、ミリング、ドリリング、等の方法が、装置内に種々の反応チャンバー及び流体チャネルを製造するウェル及びくぼみを生成するために使用され得る。マイクロ加工技法、たとえば半導体及びマイクロ電子工学産業において適切に使用される技法は、それらの材料及び方法に特に適切である。それらの技法は、たとえば、電着、低圧蒸着、写真平版、湿式化学エッチング、反応性イオンエッチング(RIE)、レーザードリリング、及び同様のものを包含する。それらの方法が使用される場

合、半導体産業に使用される材料に類似する材料、すなわちシリカ、珪素、砒化カリウム、ポリイミド支持体から装置の平面メンバーを加工することが一般的に所望されるであろう。アメリカ特許第 5,252,294号 (Kroy、など.; 引用により本明細書に組込まれる) は、生物工学用途におけるサンプル取り扱いのための珪素基材の複数ウェル装置の加工について報告している。

支持体をエッチングする写真平版法は特に、それらの支持体のマイクロ加工のために十分に適切であり、そして当業界において良く知られている。たとえば、支持体の第1シートがフォトレジストにより積層される。次に、電磁線源が写真平版マスクを通して照射され、前記シートの表面上のチャンバー及び/又はチャネルのパターンを反射するパターンでフォトレジストが暴露される。その暴露されたフォトレジストを除去した後、その暴露された支持体は、所望するウェル及びチャネルを生成するためにエッチングされ得る。一般的に好ましいフォトレジストは、半導体産業において広範に使用されているものを包含する。そのような材料は、ポリメチルメタクリレート (PMMA) 及びその誘導体、及び電子線レジスト、たとえばポリ (オレフィンスルホン) 及び同様のものを包含する (たとえば、Ghandi, "VLSI Fabrication Principles," Wiley (1983) Chapter 10(引用により本明細書に組込まれる) に、より十分に論じられている)。

例として、1つの平面メンバーの表面中に製造されたウェルは、装置の種々の反応チャンバーを製造する。この又はもう1つの平面メンバーの表面中に製造されたチャネルは、種々の反応チャンバーを流体的に連結するために使用される流体チャネルを製造する。次に、もう1つの平面メンバーが第1のメンバー上に配置され、そして結合され、それにより、第1の平面メンバーにおけるウェルが、

装置の種々の反応チャンバーである、装置の本体内のキャビティを規定する。同様に、1つの平面メンバーの表面に製造される流体チャネルは、第2の平面メンバーにより被覆される場合、装置の本体を通しての流体通路を規定する。それらの平面メンバーは、一緒に結合され又は積層され、装置の流体密封本体が製造される。装置の平面メンバーの結合は一般的に、当業界において知られている種々の方法を用いて実施され得、そして使用される材料に依存して変化する。たとえ

ば、接着剤が一般的に、平面メンバーと一緒に結合するために使用され得る。平面メンバーがたとえばガラス、珪素又はそれらの組合せである場合、熱結合、陽極性／静電又は珪素融合結合法が適用され得る。ポリマー部分のためには、類似する種類の方法、たとえば圧力を伴っての加熱結合法、溶媒に基づく結合法が、支持体部分と一緒に結合することに使用され得る。一般的に、音波溶接技法が一般的に好ましい。関連する観点においては、この接着剤テープが、反応チャンバー／チャンネル構造体の薄壁を形成する装置の1つの部分として使用され得る。

装置の十分に統合された本体の製造に関して主に記載されて来たが、上記方法はまた、装置の本体中に後でアセンブルされる装置の個々の別々の成分を加工するためにも使用され得る。

さらなる態様においては、本体は、上記材料及び製造技法の組合せを含んで成る。多くの場合、本体は射出成形されたプラスチックのいくつかの部分、及び同様のものを包含し、そして本体の他の部分はエッチングされたシリカ又は珪素平面メンバー、及び同様のものを含んで成る。たとえば、射出成形技法は、種々の反応チャンバーを規定する、平面表面における多くの別々のキャビティを形成するために使用されるが、ところが追加の成分、たとえば流体チャンネル、アレイ、等が、平面ガラス、シリカ又は珪素チップ又は支持体

上に加工され得る。次に、1組のパーツの他のパーツへの積層は、適切な流体チャンネルにより相互連結される種々の反応チャンバーの形成をもたらすであろう。

特に好ましい態様においては、装置の本体は、反応チャンバー又はチャンネルの壁のいくつかを規定するためにその表面中に製造される1又は複数のウェル又はくぼみを有する。少なくとも1つの射出成形された、プレス成形された又は機械加工されたポリマー部分から製造される。それらの射出成形された部分を製造するための金型又は金型表面は一般的に、本明細書に記載される方法、たとえば珪素金型を用いて加工され得る。射出成形又は機械加工のための適切なポリマーの例は、たとえばポリカーボネート、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、アクリル樹脂、及び市販のポリマー、及びKapton, Valox, Teflon, ABS, Delrin及び同様のものを包含する。形状的に同様に平面である第2部分は、反応チ

チャンバーの残る壁を規定するためにポリマー部分の表面に適合される。公開されたPCT 出願番号95/33846 (引用により本明細書に組込まれる) は、個々のオリゴヌクレオチドアレイを包装するために使用される装置を記載する。装置は、平面の本体内に配置されるハイブリダイゼーションチャンバーを包含する。チャンバーは、装置の本体における流路を通して入口部分及び出口部分に流体的に連結される。本体は、装置の本体を形成するために適合され、そして流路及びハイブリダイゼーションチャンバーを規定する多くの射出成形された平面部分を包含する。

サンプル及び試薬を接触せしめる流体チャネル及び反応チャンバーの表面はまた、所望する反応により良好に適合するよう変性され得る。表面は、特定の用途に依存してより疎水性又はより親水性にされ得る。他方、表面は、実施される反応により適合する全体のシ

ステムを製造するためにいずれかの数の材料により被覆され得る。たとえば、核酸分析の場合、表面への核酸の付着を妨げるために、たとえばテフロン又は他の非接着性被膜によりその表面を被覆することが所望される。さらに、絶縁体被膜がまた、不足、又は電気分解からの過剰ガス形成を阻止するために、電気導線が流体と接触して配置されるそれらの場合において所望される。そのような絶縁体は、当業界において良く知られているもの、たとえば酸化珪素、セラミック又は同様のものを包含する。追加の表面処理は、下記により詳細に記載されている。

図2A及び2Bは、本発明の装置への包含のための反応チャンバーの1つの態様の代表的な図を示す。反応チャンバーは、その表面中に製造された、すなわち機械処理され又は成形されたウェル104を有する機械処理された又は射出成形されたポリマー部分102を包含する。このウェルは、図2Aに示されるようにウェル開口部の反対端で閉じられ得、又は場合によっては、図2Bに示されるように、任意のペントの包含のために、追加の開口部118を供給され得る。

反応チャンバーはまた、その反応チャンバーに及びそれから流体サンプルを輸送するための追加の要素により供給される。それらの要素は、全体の装置、追加の反応チャンバー、貯蔵チャンバー及び／又は複数の分析チャンバーのための入

口／出口部分に反応チャンバーを連結する1又は複数の流路(それぞれ、図2A及び2Bにおける122及び110)を包含する。

典型的には、構造的に平面の第2部分124は、反応チャンバーのためのクローシャーを規定するためにポリマー部分に適合される。この第2部分は、図2A及び2Bに示されるように流路を組込むことができ、又は単に、第1ポリマー部分(示されていない)の表面

に供給される流路の追加の壁を規定することができる。典型的には、この第2部分は、全体の装置における入口部分に、又はもう1つの反応又は分析チャンバーに反応チャンバーを流体的に連結するために、その表面の1つに製造される一連の流路を含んで成るであろう。再び、この第2部分は、射出成形又は機械処理技法により製造される第2ポリマー部分であり得る。他方では、この第2部分は、種々の他の材料、たとえばガラス、シリカ、珪素又は他の結晶性支持体から製造され得る。それらの支持体のために適切なマイクロ加工技法は一般的に良く知られており、そして上記に記載される。

第1の好ましい態様においては、反応チャンバーは、図2Aに示されるように、入口／出口弁構造を伴わないで供給される。それらの態様のためには、流路122は、ポリマー部分の表面と適合される第2部分の表面に供給され、その結果、第1ポリマー部分への第2部分の適合に基づいて、流路122は反応チャンバー104に流体的に連結される。

あるいは、第2の好ましい態様においては、反応チャンバーは、そこに流体サンプルを保持するために反応チャンバーを封止するための入口／出口弁構造を供給され得る。そのような弁構造の例は、図2Bに示されている。特に、ポリマー部分に適合される第2部分124は多くの適合される平面メンバーを含んで成り、ここで第1平面メンバー106が反応チャンバーの壁を規定するために第1ポリマー部分102と適合される。第1平面メンバー106は、反応チャンバーへの入口を規定する、それを通じて配置される開口部108を有する。この第1平面メンバーはまた、第1ポリマー部分102と適合される表面の反対表面にエッチングされた流路110を含む。流路は反応チャンバー入口108に隣接して(但し、その入口内

ではない)、終結する。第1平面メンバーは一般的に、上記方法を用いて、上記

材料のいずれかから製造され得る。第2平面メンバー112は、前記第1メンバーに適合され、そして入口108を通して拡張し、そして流路110とオーバーラップするダイアフラム弁114を含み、その結果、そのダイアフラムの撓みが第1平面メンバーと第2メンバーとの間にギャップをもたらし、それにより、入口108を通して、反応チャンバー104と流路110との間に流体結合を創造する。前記ダイアフラム弁の撓みは、種々の方法、たとえば真空の適用、ダイアフラム弁に結合される電磁及び/又は圧電作動器、及び同様のものを包含する方法により行なわれ得る。撓み可能なダイアフラムを可能にするためには、第2平面メンバーは典型的には、柔軟な材料、たとえば珪素、シリコン、ラテックス、マイラー、ポリイミド、テフロン又は他の柔軟なポリマーから、少なくとも部分的に加工されるであろう。反応チャンバー及び流路に関して、それらのダイアフラムはまた、ミニチュア規模のものであろう。特に、装置に使用される弁及びポンプダイアフラムは典型的には、それらが流体的に連結されるチャンバー又は流体路の大きさに依存して、大きさに変化するであろう。しかしながら、一般的に、それらのダイアフラムは、弁ダイアフラムのためには約0.5~約5mmの範囲、及びポンピングダイアフラムのためには約1~約20mmの範囲であろう。図2Bに示されるように、第2部分124は、弁114の撓みのために圧力又は真空の適用のための開口部126を有する追加の平面メンバー116を含む。

特定の分析に関連する試薬が装置を製造するために使用される材料、たとえば珪素、ガラス又はポリマー部分と不適合性である場合、種々の被膜がそれらの試薬と接触するそれらの部分の表面に適用され得る。たとえば、珪素要素を有する成分は、たとえば金又はニッケルの金属層又は窒化珪素層により被覆され得、すなわちそれら

の試薬との悪影響反応を回避するために表面上をスパッターされ得又は電気メッキされ得る。同様に、不活性ポリマー被膜、たとえばテフロン及び同様のもの、ピラリン (pyraline) 被膜又は表面シラン化変性がまた、チャンバー及び/又は

チャンネルの内部表面に適用され得る。

図2Bに示される反応/貯蔵チャンバー104は、流体が導入される場合、チャンバーに存在する置換されるガスの開放のために、任意のベント118により示される。好ましい態様において、このベントは、流体の通過を可能にしないでガスの通過を可能にするガス透過性流体バリアー120、たとえば不完全湿潤性フィルタープラグにより固定され得る。次のような種々の材料が不完全湿潤性フィルタープラグとしての使用のために適切である：多孔性疎水性ポリマー材料、たとえばアクリル樹脂の延伸繊維、ポリカーボネート、テフロン、プレスポリプロピレン繊維、又はいずれかの市販のフィルタープラグ (American Filtrona Corp., Richmond, VA, Gelman Sciences、及び同様のもの)。他方、疎水性膜が、類似する構造を供給するためにスルーホール上に結合され得る。変性されたアクリルコポリマー膜は、たとえばGelman Sciences (Ann Arbor, MI) から市販されており、そして粒子ートラックによりエッチングされたポリカーボネート膜はPoretics, Inc. (Livermore, CA)から入手できる。加熱されたチャンバーのガス抜きは、サンプルからの流体の過剰蒸発を防止しながら、ガスの発生を可能にするために、サンプルの蒸発に対するバリアー、たとえば還流チャンバー、又はそのチャンバー内に及びサンプルの上面上に配置される鉱油層を組込むことができる。

本明細書に記載されるように、本発明の装置の全体の幾何学的形状は、多くの形を取ることができる。たとえば、装置は、連続して

配置される、多くの反応チャンバー、貯蔵チャンバー及び分析チャンバーを組込むことができ、それにより、流体サンプルはチャンバーを通して連続的に移動され、そしてそれぞれの操作がそれらのチャンバーにおいて行なわれる。他方では、装置は、中心チャンネル又はチャンバーのまわりに配置され、そしてそれに流体的に連結される種々の反応/貯蔵/分析チャンバーを有する中心流体分配チャンネル又はチャンバーを組込み、ここで前記中心チャンネル又はチャンバーは種々のチャンバーへのサンプルの再分配のための導管又はハブとして作用する。

装置の一連の幾何学的形状の例は、図3に示される。特に、例示される装置は、連続して流体的に連結される上記の多くの操作を実施するために多くの反応/

貯蔵／分析チャンバーを包含する。

図3における装置の代表的な図は、連続的な幾何学的形状で配置されるいくつかの反応チャンバーを含んで成る装置を示す。特に、装置200の本体は、反応チャンバー202、206、210、214及び218を組込む。それらのチャンバーは、それぞれ流路208、212及び216により連続的に、流体的に連結されている。

上記に概略される種々の操作を実施する場合、それらの反応チャンバーの個々は、1又は複数の異なった機能を割り当てられる。たとえば、反応チャンバー202は、流体サンプル、すなわち細胞含有サンプルを受けるために適合されたサンプル収集チャンバーであり得る。たとえば、このチャンバーは、サンプルの受容のために適合された装置の外部への開口部を包含する。この開口部は典型的には、サンプルの漏れを防止するための封止可能クロージャー、たとえばサンプルが導入されるか又は拒絶される弁、チェックバルブ、又は隔壁を組込むであろう。いくつかの態様において、装置は、宿主、患者、サンプルバイアル又は管、又はサンプルの他の起源からサ

ンプル収集チャンバーへのサンプルの直接的な移行のために、装置の本体中に組込まれ、そしてサンプル収集チャンバーと流体連結して組込まれる皮下注射針又は他のサンプル導管を包含することができる。

さらに、サンプル収集チャンバーは、上記のように、長期貯蔵のためにサンプルを安定化するための試薬をそこに配置することができる。他方、それらの試薬は、サンプル収集チャンバーに隣接して及びそれと流体的に連結して試薬貯蔵チャンバー内に配置され得る。

サンプル収集チャンバーは、サンプル内の細胞からの核酸の抽出が行なわれ得る第2反応チャンバー210に第1流路204を通して連結される。これは、サンプルが完全な細胞を含む場合に行なわれるべき分析操作に適合される。抽出チャンバーは典型的には、サンプル収集チャンバーに連結されるが、しかしながら、多くの場合、抽出チャンバーはサンプル収集チャンバー内に組込まれ、そしてそのチャンバーの一部として存在することができる。前で記載されたように、抽出チャンバーは、細胞から核酸を抽出するための物理的及び／又は化学的手段を包含



することができる。

抽出チャンバーは、サンプルから抽出された核酸の増幅が実施される第3反応チャンバー210に、第2流路208を通して流体的に連結される。増幅工程は、サンプルが増幅チャンバー中に導入される場合に開始する。前で記載されたように、増幅試薬は外部から導入され得、又は好ましくは、反応チャンバー内に前もって配置されるであろう。しかしながら、もう1つの態様においては、それらの試薬は、任意の隣接する試薬チャンバーから又は外部の源から、増幅チャンバーにおける封止可能開口部を通して増幅チャンバーに導入されるであろう。

PCR増幅法においては、変性及びハイブリダイゼーションサイクルが好ましくは、サンプルの反復された加熱及び冷却により行なわれるであろう。従って、PCRに基づく増幅チャンバーは典型的には、熱サイクルを実施するために反応を加熱するための温度調節器を包含する。たとえば、加熱要素又は温度調節ブロックが、増幅チャンバーの外表面に隣接して配置され、それにより、増幅チャンバーに熱を移行する。この場合、好ましい装置は、熱調節が所望されるチャンバーのために薄い外壁を含むであろう。この薄壁は、薄い被覆要素、たとえばポリカーボネートシート、又は高温テープ、すなわちKaptonテープ（たとえば、3M Corp.から市販されている）上のシリコン接着剤であり得る。微小規模のPCR装置はこれまで報告されている。たとえば、公開されたPCT出願番号WO94/05414 (Northrup and White) は、マイクロヒーター、たとえば抵抗ヒーターを組込む、PCRチャンバーとして使用するためのミニチュア化された反応チャンバーを報告する。チャンバーの高い表面積：体積比は、そこに配置される試薬のひじょうに急速な加熱及び冷却を可能にする。同様に、アメリカ特許第5,304,487号 (Wilding など) はまた、マイクロ加工されたPCR装置の使用を論じる。

好ましい態様において、増幅チャンバーは、サンプルの熱循環のために、増幅チャンバー内に又はそれと隣接して配置される調節可能ヒーターを組込むであろう。熱循環は、反応の特定の段階のための所望する温度を達成するためにヒーターに供給される電流を変えることによって実施される。他方、PCR反応のための熱循環は、異なっているが、しかし一定の温度を有する、多くの異なった反応チ

ャンバー又は同じ反応チャンバーの領域間の流体サンプルを移行し、又は多くの異なった温度“域”を通して移動するセルペンチンチャンネルを通してサンプルを流すことによって達成され得る。加熱は

、増幅チャンバーをレーザー又は他の光又は磁場線源に暴露することによって供給され得る。

増幅チャンバーは、流路、たとえば流路212を通して、追加の調製操作、たとえばラベリング又は断片化を実施できる追加の反応チャンバー214に流体的に連結される。

第4流路216は、ラベリング又は断片化チャンバーを分析チャンバー218に連結する。示されるように、分析チャンバーは、そのチャンバーの底面としてオリゴヌクレオチドアレイ220を含む。追加のチャンバー218は、任意に又はさらに、微小細管電気泳動装置226、及びたとえばチャンバー210に流体的に連結される、拡張反応を実施するための追加の調製反応チャンバー、たとえば224を含んで成る。分析チャンバーは典型的には、少なくとも1つの表面として、実施される特定の分析の観察又は走査のための透明窓を有するであろう。

図4A-Cは、微小細管電気泳動装置の1つの態様を示す。この態様においては、分析されるべきサンプルがサンプル溜め402中に導入される。このサンプル溜めは分離したチャンバーであり得、又は前の反応チャンバーから導びく流路の一部であり得る。溜め404、406及び414は、サンプル/運転緩衝液により満たされる。図4Aは、プラグ負荷によるサンプルの負荷を示しており、ここでサンプルは、緩衝液溜め406及びサンプル溜め402を通しての電流の適用により、充填チャンネル416及び細管チャンネル412の交点を横切って引き抜かれる。他の態様においては、サンプルは、図4Bに示されるように、サンプル溜め402及び廃棄物溜め414を通して電流を適用することによって負荷される“スタック(stack)”である。サンプル充填に続いて、電場が緩衝液溜め404及び廃棄物溜め414を通して適用され、細管チャンネル412を通してサンプルが電気泳動され

る。サンプルの流れは、図4Cに示される。単一の細管のみが図4A-Cに示さ

れているが、本発明の装置は典型的には1つ以上の細管を含んで成り、そしてより典型的には、同時に実施される、4又はそれ以上の細管のアレイを含んで成る。微小細管電気泳動装置の加工は一般的に、本明細書において記載される方法を用いて、及びたとえWoolley and Mathies, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 91: 11348-11352(1994) (引用により本明細書に組込まれる)に記載されるようにして実施され得る。典型的には、個々の細管は、異なったジデオキシヌクレオチドの導入のために別々の拡張反応チャンバーに流体的に連結されるであろう。

上記に示されるように、本発明の装置内の反応チャンバーの他の配置は、中心チャンバーのまわりに配置され、そしてそのチャンバーに流体的に連結される多くの別々の反応/貯蔵/分析チャンバーへの流体サンプルの収集及び分配のための中心チャンバーを有する中心集中形状を包含する。この中心集中化された形状の例は図5に示される。示される特定の装置においては、流体サンプルは、典型的にはサンプル収集チャンバー504に流体的に連結されるサンプル入口502を通して装置中に導入される。次に、流体サンプルは、流路506を通して中心チャンバー508に輸送される。中心チャンバー内に達したらすぐに、サンプルは、中心チャンバーのまわりに配置され、そして流体的に連結される多くの反応/貯蔵/分析チャンバーのいずれかの1つに輸送され得る。示されるように、反応チャンバー510、512及び514の個々は、中心チャンバー508と反応チャンバーとの間の流体を開放し、そして閉じるための、図2Bに示されるようなダイアフラム516、518及び520をそれぞれ包含する。追加の反応チャンバーがその中心チャンバーに流体的に連結され、又は他方では、上記反応チャンバーのいずれかに連結され得る。

ある観点においては、中心メンバーは、ハブ及びポンピングチャンバーの両者としての二重機能を有することができる。特に、この中心ポンピングチャンバーは、1又は複数の追加の反応及び/又は貯蔵チャンバー、及び1又は複数の分析チャンバーに流体的に連結され得る。その中心ポンピングチャンバーは再び、上記のように全体として、装置により実施されるべき種々の操作のためのハブとして機能する。この態様は、多くの操作にサンプルを供給するための単一のポンピ

ングチャンバーの利点、及び中心ポンピングチャンバー上のもう1つの弁を開くことによって装置内の追加のサンプル調製操作を容易に組込む能力を提供する。

特に、中心チャンバー508は、チャンバーの1つの表面としてダイアフラムポンプを組み込み、そして好ましい観点においては、ダイアフラムが偏向されない場合、ゼロ置換を有するであろう。そのダイアフラムポンプは一般的に、反応チャンバーについての上記の弁構造体に類似するであろう。たとえば、ダイアフラムポンプは一般的に、種々の柔軟な材料、たとえば珪素、ラテックス、テフロン、マイラー及び同様のもののいずれか1つから加工されるであろう。特に好ましい態様においては、ダイアフラムポンプは珪素から加工される。

図5A及び5Bの両者に関しては、中心チャンバー508は、流路506を通してサンプル収集チャンバー504に流体的に連結される。流路506のサンプル収集チャンバー端は、流路を止めるためのダイアフラム弁524を包含する。流体サンプルは典型的には、装置の本体中の封止可能開口部502、たとえば弁又は隔壁を通してサンプル収集チャンバー中に導入される。さらに、サンプルチャンバー504は、サンプル導入の間、ガス又は流体の置換を可能にするためにベントを組込むことができる。

サンプルがサンプル収集チャンバー中に導入され後すぐに、それは、ポンプダイアフラム526の操作により中心ポンピングチャンバー508中に引き抜かれ得る。特に、サンプルチャンバー弁524の開口は、流路506を開く。ポンプダイアフラム526の続く引取り又は撓みは、ポンピングチャンバー508内に負の圧力を創造し、それにより、流路506を通して中心チャンバー中にサンプルを引き抜く。サンプルチャンバー弁524の続く閉鎖及びポンプダイアフラム526の緩和は、装置における追加のチャンバーにサンプルを供給するために使用され得る、ポンピングチャンバー508内に正の圧力を創造する。たとえば、サンプルに特定の試薬を添加することが所望される場合、それらの試薬は、隣接する貯蔵チャンバー510内に液体又は固体形で貯蔵され得る。開口弁516は、流路528を開き、ダイアフラムポンプの緩和に基づいて、貯蔵チャンバー50中へのサンプルの供給を可能にする。ポンピングチャンバーの操作は、貯蔵チャンバーに及びそれからサン

ル／試薬混合物を反復して引き抜き、そして押出すことによって、試薬を混合するためにさらに使用され得る。これは、装置内の追加の混合成分の必要性を排除する追加の利点を有する。追加のチャンバー／弁／流路構造体は、試薬貯蔵チャンバー、追加の反応チャンバー又は追加の分析チャンバーを供給するために必要とされる場合、ポンピングチャンバー508に流体的に連結されて供給され得る。図5Aは、流路530を通してポンピングチャンバー508に流体的に連結される、追加の反応／貯蔵チャンバー514及び弁520を示す。これは典型的には、分析されるべきサンプルの性質、実施されるべき分析、及び所望するサンプル調製操作に依存して変化するであろう。いずれかのサンプル調製操作に続いて、弁520の開口、及びポンピングチャンバーへの他の弁の閉鎖は、分析装置、たとえばオリゴヌクレオチドアレイに対するサンプル

中の核酸のハイブリダイゼーションを決定するためのオリゴヌクレオチドアレイ、又はサンプルのサイズに基づく分析を行なうための微小細管電気泳動装置を包含する反応チャンバー514への流路530及び532を通してのサンプルの供給を可能にする。

本発明の装置内の流体の輸送は、多くの種々の方法により行なわれ得る。たとえば、流体輸送は、外部又は内部源のいずれかにより供給される差圧の適用により影響され得る。他方、装置中に導入される内部ポンプ要素は、装置を通して流体サンプルを輸送するために使用され得る。

第1の態様においては、流体サンプルは、発生チャンバー（これから、サンプルが輸送される予定であるチャンバー）から受容チャンバー（これに、流体サンプルが輸送される予定であるチャンバー）に正の差圧を適用することによって、流路を通して1つの反応／貯蔵／分析チャンバーからもう1つのチャンバーに移動される。差圧を適用するためには、装置の種々の反応チャンバーが典型的には、圧力源（正又は負）に反応チャンバーを連結する圧力入口を組込むであろう。容易に論じるために、受容チャンバーへの負の圧力の適用が一般的に、本明細書に記載されるであろう。しかしながら、本発明の開示に基づけば、発生チャンバーへの正の圧力の適用は、単にわずかな変性を伴って、効果的になるであろうこ

とを、当業者は理解するであろう。

1つの方法において、特定の反応チャンバーへの差圧の適用は一般的に、受容チャンバーにおける圧力を選択的に低めることによって実施され得る。特定の受容チャンバーにおける圧力を選択的に低めることは、種々の方法により実施され得る。たとえば、反応チャンバーのための圧力入口は、圧力源に開口されるよう選択的に操作され得る調節可能弁構造体により装備され得る。次に、サンプルチ

ャンバーへの圧力源の適用は、より低い圧力で存在する次の反応チャンバー中にサンプルを押し進める。

典型的には、装置は、外部減圧源を種々の反応／貯蔵／分析チャンバーに向けるための圧力／減圧マニホールドを含むであろう。好ましい減圧マニホールドの特に好ましい例は、図6A、6B及び6Cに例示される。

減圧／圧力マニホールドは、個々の対の連結された反応チャンバー間の段階的な差圧を生成する。たとえば、周囲圧力が1の値を有するものとして定義される場合、減圧が第1反応チャンバーに適用され、これは $1-3X$ と書かれ、ここで $X$ は増加する差圧である。 $1-2X$ の減圧が第2反応チャンバーに連続して適用され、そして $1-X$ の減圧が第3反応チャンバーに適用される。従って、第1反応チャンバーは最低圧力で存在し、そして第3チャンバーは最高圧力で存在し、そして第2チャンバーは中間レベルの圧力で存在する。しかしながら、すべてのチャンバーは、周囲圧力、たとえば大気圧以下である。サンプルは、周囲圧力(1)と差が $-3X$ である反応チャンバーに適用される減圧( $1-3X$ )との間の差圧により第1反応チャンバー中に抜き取られる。サンプルは、第1反応チャンバーと第2反応チャンバーとの間の差圧(それぞれ $1-3X$ 対 $1-2X$ )のために第2反応チャンバーは移動しない。第1反応チャンバーにおいて行なわれる操作の完結に基づいて、減圧が第1チャンバーから解除され、第1チャンバーが周囲圧力、たとえば1に達せられる。次に、サンプルは、第1反応チャンバーの周囲圧力と第2チャンバーの減圧との間の差圧(たとえば、1対 $1-2X$ )により、第1チャンバーから第2チャンバー中に抜き取られる。同様に、第2反応チャンバーにおいて行なわれるべき操作が完結される場合、このチャンバーへの減圧

が除去され、そしてサンプルは第3チャ

ンバーに移動する。

差圧流体輸送システムを実施するための空気マニホールド形態の代表的な図が、図6Aに示されている。その空気マニホールドは、主要減圧チャネル604に結合される減圧液602を含む。その主要減圧チャネルは、連続的に、流体的に連結される、それぞれの反応チャンバー612、614及び616に連結される分岐チャネル606、608及び610に連結される。第1反応チャンバー616は典型的には、反応チャンバー内に流体サンプル及び圧力を保持するための封止可能クロージャーを典型的には包含するであろうサンプル入口640を包含する。個々の分岐チャネルは、その分岐チャネル内に組込まれる1又は複数の流体抵抗体618及び620を供給される。それらの流体抵抗体は圧力／減圧源からの圧力の変換をもたらし、すなわちガス圧力又は減圧の段階的低下がその抵抗を通して適用される。流体抵抗体は、種々の異なった構造を用いることができる。たとえば、チャネルの直径又は断面積を狭くすることが典型的には、そのチャネルを通しての流体抵抗をもたらすであろう。同様に、圧力が適用されるチャネルを効果的に狭くする、それを通して配置される1又は複数の穴を有するチャネル内のプラグが、そのプラグにおける穴の数及び／又はサイズに依存して変えられ得る流体抵抗をもたらすであろう。さらに、そのプラグは、プラグを通しての流体抵抗を提供する多孔性材料から加工され得、ここで前記抵抗は前記材料の多孔度及び／又は使用されるプラグの数に依存して変えられ得る。チャネルの長さの変動もまた、流体抵抗を変えるために使用され得る。

個々の分岐チャネルは典型的には、圧力入口624を通して反応チャンバーに圧力中核622で連結されるであろう。圧力入口624は典型的には、減圧に基づく方法の場合、空気マニホールド中へのサンプルの抜き取りを防止するために、不完全湿潤性フィルタープラグ

626により適合されるであろう。不完全湿潤性フィルタープラグは一般的に、当業界において知られており、且つ上記のような種々の材料から調製され得る。個

々の分岐チャネルは、ベント630を通して周囲圧力に開口されるベントチャネル628に連結される。示差流体低抗体632がベントチャネル628中に組込まれる。流体低抗体632により供給される流体抵抗は、流体抵抗体636により供給される流体抵抗よりも低いであろう流体低抗体634により供給される流体抵抗よりも低いであろう。上記のように、この示差流体抵抗は、ベントチャネルの直径を変えることにより、単一のベントチャネルに含まれるチャネルの数を変えることにより、チャネルの長さを変えることにより、又はそれを通して配置される種々の数の穴を有するベントチャネルにプラグを供給することにより、達成され得る。

個々のベントチャネルのための種々の流体抵抗は、個々の反応チャンバーに適用される種々のレベルの減圧をもたらし、ここで反応チャンバー616は、上記のように、 $1-3X$ の圧力を有し、反応チャンバー614は $1-2X$ の圧力を有し、そして反応チャンバー612は $1-2X$ の圧力を有する。与えられた反応チャンバーの圧力は周囲温度に高められ、従って、周囲圧力へのチャンバーの開放により、続くチャンバー中へのサンプルの抜き取りを可能にする。これは典型的には、分岐チャネルにおいて周囲圧力に封止可能な開口部638を提供することによって達成される。この封止可能な開口部は、調節可能な弁構造体、又は他方では、周囲圧力への特定の反応チャンバーの達成を可能にするために所望する時点で突き刺され得る破裂膜であり得、それにより、続くチャンバー中へのサンプルの抜き取りを可能にする。破裂膜の突き刺しは、装置内に組込まれるソレノイド操作のピンの包含、又は装置の基本単位（下記で詳細に論じられる）により実施され得る。多くの場合、より高い圧力で存在す

る前の又は続く反応チャンバーからの逆流を阻止することが所望される。これは、一路逆止め弁により、反応チャンバー644間の流路を装備することによって達成され得る。一路弁構造体の例は、ボール及び受座構造体、フラップ弁、ダックビル(duck billed)逆止め弁、滑り弁構造体、及び同様のものを包含する。

減圧に基づく空気マニホールドを用いる3種の反応チャンバー間の圧力プロフィールのグラフが図6Cに示される。実線は、個々の反応チャンバー／圧力中核の開始圧力を示す。点線は、操作の間の圧力プロフィールを示す。破裂膜の突き



刺しは、周囲圧力への反応チャンバーの圧力の上昇をもたらし、特定のチャンバーと続くチャンバーとの間に創造される圧力低下をもたらす。この圧力低下は、第1反応チャンバーからの続く反応チャンバーへのサンプルの抜き取りを可能にする。

類似する観点においては、正の圧力源が、続くチャンバーにサンプルを押込めるために始めのチャンバーに適用され得る。これに関して有用な空気圧力マニホールドが図6Bに示される。この観点においては、圧力源646が主要チャネル604に正の圧力を提供する。サンプルが第1反応チャンバーに導入される前、調節可能弁648が開口され、圧力源から圧力を開放し、そしてサンプルの導入のために周囲圧力での第1反応チャンバーシリーズ650の維持を可能にする。再び、前記第1チャンバーシリーズは、封止可能クロージャー642を有するサンプル入口640を含む。サンプルが第1反応チャンバー650中に導入された後、調節可能弁648は閉じられ、システムを加圧する。適切な調節可能弁は、種々の市販のソレノイド弁及び同様のものを包含する。この適用においては、個々の続くチャンバーが、上記のように、適切な流体低抗体及びベントの存在により、段階的に高い圧力で維持される。基本圧力が始めの圧力中核652で

適用される。第2チャンバー654へのサンプルの供給が所望される場合、封止可能開口部656が周囲圧力に開放される。これは、第2チャンバー654の周囲圧力への移動を可能にし、始めの圧力中核652で適用される圧力でのサンプルの第2チャンバー654中への押し進めを可能にする。従って、上記に示される第1反応チャンバー650は、始めの圧力中核652でのこの圧力の適用により、 $1 + X$ の圧力で維持される。第2反応チャンバー654は圧力 $1 + 2X$ で維持され、そして第3反応チャンバー658は $1 + 3X$ の圧力で維持される。封止可能弁654の開放は、第2反応チャンバーの圧力の1（又は周囲圧力）への低下をもたらす。第1反応チャンバーから第2反応チャンバーへの差圧 $X$ は、第1チャンバーから第2反応チャンバー及び最終的には、第3反応チャンバーへのサンプルの押し込みを可能にする。流体低抗体660が、封止可能弁656が開放される場合、過剰の圧力の漏れを阻止するために、圧力中核662と封止可能弁656との間に供給される。こ

れは、サンプルを続くチャンバー中に押し込むために、サンプルの後ろを正の圧力で維持するシステムを可能にする。

関連する観点においては、調節可能圧力源が、装置を通してサンプルを押し込むために始めの反応容器に適用され得る。この圧力源は、チャンバーからチャンバーへのサンプルの移動が必要とされる場合、断続的に適用される。種々の装置、たとえば注射器又は他の正の置換ポンプ、又は同様のものが、始めの反応チャンバーに断続的圧力を適用することに使用され得る。他方、装置の大きさの規模のためには、熱空気ポンプが容易に使用され得る。そのようなポンプの例は典型的には、加熱ヒーター、たとえば圧力チャンバーに配置される小規模抵抗ヒーターを包含する。また、多量の調節された蒸気圧流体、たとえば弗素化された炭化水素液体、たとえば 3 M C

orp. から入手できるフッ素処理された液体を、チャンバー内に配置する。広範囲の入手できる蒸気圧を有するそれらの液体は市販されている。ヒーターの調節可能温度の上昇は、始めの反応チャンバーに流体的に連結される圧力チャンバーにおける圧力を高める。この圧力の上昇は、1つの反応チャンバーから次の反応チャンバーへのサンプルの移動をもたらす。サンプルが続く反応チャンバーに達する場合、その圧力チャンバーにおける温度は低められる。

それらの装置へのガス透過性流体バリアー、たとえば不完全湿潤性フィルタープラグ又は疎水性膜の包含はまた、その装置内での流体の移動のためには無官能な流体方向づけ及び調節システムを可能にする。たとえば、上記のように、流体入口の反対側の反応チャンバーの端で組込まれるそのようなフィルタープラグは、チャンバー中への流体成分の導入の間、反応チャンバーに存在する空気又はガスの追い出しを可能にするであろう。チャンバーの充填に基づいて、流体サンプルは疎水性プラグと接触し、従って、最的な流体の流れを停止する。前に記載されたような流体抵抗はまた、過剰の流体抵抗を提供するために十分に狭い流路を用いて、この同じ結果を達成するために、ガス透過性流体バリアーとしても使用され得、それにより、空気又はガス流を可能にしながら、流体の流れを効果的に止めたり、又は遅めたりする。次に、チャンバーからの流体の追い出しは、プラ

グを差込まれたベントでの正の圧力の適用を包含する。これは、チャンバー中への流体の流れを調節するために入口での弁を伴わないで満たされ得るチャンバーを可能にする。しかしながら、ほとんどの観点においては、単一の弁が、チャンバー内の流体サンプルの保留を確保し、又は共通チャネルに連結される多くのチャンバーの1つのチャンバーに流体サンプルを方向づけるための機構を提供するために、チャンバー入口で使用されるであろう。

このシステムを用いる反応チャンバーの代表図が図12Aに示される。手短に言及すれば、反応チャンバー1202は、弁1208により流体路1206から封止される流体入口1204を包含する。典型的には、この弁は、本明細書に記載されるように、種々の構造を用いることができるが、しかし好ましくは、空氣的に、磁氣的に又は電氣的に置換され得る柔軟なダイアフラムタイプの弁である。好ましい観点においては、前記弁は、たとえば弁座から離れてダイアフラムを偏向せしめるために弁に対して減圧を適用することによって、空氣的に調節され、それにより、隣接する通路中に開口部を創造する。その入口から反対側の端で、出口ベント1210が存在し、そして疎水性膜1212がこの出口ベントを横切って配置される。多くの異なった市販の疎水性膜、たとえばGelman Sciences から入手できるVersapore 20 OR膜が、本明細書に記載されるように使用され得る。反応チャンバー中に導入される流体は、それが膜1212に接触するまで、チャンバーを満たす。次に、弁の閉鎖は、チャンバーの外部の要素からの影響を受けずに、反応チャンバー内の反応の実施を可能にする。

もう1つの例においては、それらのプラグ又は膜が、装置内の流体のガス抜き又は脱泡のために使用され得る。ガス抜きのためには、チャンバーは、1又は複数のベントを、又は溶解された又は取り込まれたガスの通過を可能にするために疎水性膜により完全に又は実質的に結合される1つの壁を供給され得る。さらに、減圧が、サンプル流体からガスを抜き取るために膜の外表面上に適用され得る。反応チャンバー及び流体通路の小さな断面寸法のために、気泡が流体の流れを妨害し、そして／又は不規則なデータの生成をもたらすので、そのようなガスの排除は高い重要性を持つ。

関連する観点において、そのような膜は、装置中に故意に導入される気泡を除去するために、すなわち分離されることが前もって所

望される2種の流体を混合するために使用され得る。たとえば、別々の流体、たとえば試薬が、流体プラグを分離するが、しかし流体の流れを阻害しない十分なガス気泡により分離される、単一のチャネル又は脱泡チャンバー中に導入され得る。次に、それらの流体プラグが、ここに配置されるベントを有するチャネルにそって流され、ここで前記ベント口疎水性膜を包含する。流体プラグがその膜を通して流れるにつれて、ガスが前記膜を横切って追い出され、それに基づいて、2種の流体は混合するであろう。そのような脱泡チャンバーの図的な例は、図12Bに示される。

図12Cは、流体の流れの調節のために疎水性膜結合のベントを用いる流体流れシステムを用いる装置の図示である。示されるように、装置1250は、主要チャネル1255を包含する。その主要チャネルは、一連の別々のチャンバー1254~1260に流体的に連結される。主要チャネル1252とのそれらの流体連結の個々は、主要チャネルとのそれらの流体連結の交点で、それぞれ、別々の弁1262~1268の包含により仲介される（開放又は閉鎖される）。さらに、種々のチャンバーの個々は典型的には、外部環境に対するガス抜き口1270~1276を包含し、このガス抜き口は典型的には、疎水性又は不完全湿潤性膜により結合されるであろう。このシステムの基本デザインは、図5に示される装置において及び中心分配チャンバー又はチャネルを用いる装置において示される。

操作においては、サンプル又は他の流体は、逆止め、又は他の封止可能液体入口1278又は1280を通して主要チャネル1252中に導入され得る。主要チャネルと選択されたチャンバーとの流体連結でのエラストマー弁の選択的開放を組合して、流体入口への正の圧力の適用は、流体を前記チャンバー中に押し進め、選択されたチャンバーの端でのガス抜き口を通しての空気又は他のガスを、そのガス抜き

口が流体と接触するまで、追出し、これに基づいて、流体の流れが止められる。次に、選択されたメンバーに対する弁は、チャンバー内の流体を封止するために

閉鎖された位置に戻され得る。上記のように、流体の流れのために必要とされる必須の差圧は、他方では又はさらに、流体の方向が調べられるガス抜き口で負の圧力の適用を包含する。

図12Cに示される装置を組込む特定の例として、主要チャネル1252中に導入されるサンプルはまず、弁1262を開放し、そして入口部分1278で正の圧力を適用することによって、ガス抜きチャンバー1254中に押込まれる。流体がガス抜きチャンバーを満たしたらすぐに、弁1262が閉じられる。次に、流体のガス抜きが、ガス抜き口1270を通して配置される疎水性膜を通してサンプルに対して減圧を適用することにより実施され得る。次に、ガス抜きされたサンプルは、弁1262及び1264を開放し、そしてガス抜きチャンバーのガス抜き口1270に正の圧力を適用することによって、ガス抜きチャンバー1254から、たとえば反応チャンバー1256に移動され得る。次に、流体は、ガス抜きチャンバー1254から、主要チャネル1252を通して反応チャンバー1256に押出される。流体が反応チャンバーを満たす場合、それは疎水性膜と接触し、それにより、流体の流れを止める。示されるように、装置は、容積測定又は測定チャンバー1258、及びそれぞれ、類似する、弁：ガス抜き口配置1266：1274及び1268：1276を包含する貯蔵チャンバー1260を包含する。次に、流体は、記載されるように他のチャンバーに選択的に向けられる。

図12Dは、図12Cに図示される操作を実施するための射出成形支持体の部分の上面図を示す。示されるように、この装置は、流体入口1278及び1280（示されていない）と流体的通じる液体負荷チャンバー1278a及び1280aを包含する。それらの流体入口は典型的には

、射出成形部分に加工され、たとえば負荷チャンバー中に穴あけされ、又はオーバーレイ平面メンバー（示されていない）中に加工され得る。また、反応チャンバー1254、ガス抜きチャンバー1256及び1256a、測定チャンバー1258及び貯蔵チャンバー1260も含まれる。それらのチャンバーの個々は、主要チャネル1252に流体的に連結される。

装置中の種々の反応チャンバーにより行なわれる多くの操作は、調節可能な温度を必要とする。たとえば、上記のようなPCR増幅は、鎖分離温度、アニーリン

グ反応温度及び拡張反応温度間でのサンプルの循環を必要とする。多くの他の反応、たとえば拡張、転写及びハイブリダイゼーション反応がまた、一般的に、最適化された調節された温度で実施され得る。本発明の装置内の温度調節は一般的に、当業界において良く知られている方法を用いて調製される薄フィルム抵抗ヒーターにより供給される。たとえば、それらのヒーターは、良く知られた方法、たとえばスパッター法、調節された蒸着法及び同様の方法を用いて、反応チャンバー内に又はそのチャンバーに隣接して適用される薄金属フィルムから加工され得る。その薄フィルムヒーターは典型的には、ヒーターを通して電流を供給する電源に電氣的に連結されるであろう。その電氣的連結は、前記ヒーターについて記載される方法に類似する方法を用いて加工されるであろう。

典型的には、それらのヒーターは、加熱の結果として逆効果を伴わないで、100℃以上の温度を生成することができる。低抗体ヒーターの例は、たとえば公開されたPCT 出願番号W094/05414に論じられるヒーター、積層された薄フィルムNi Cr/ポリイミド/銅ヒーター、及びグラフファイトヒーターを包含する。それらのヒーターは、反応チャンバーの1つの表面上に層として供給されるか、又は反

応チャンバー中への組込みのための成形された又は機械処理された挿入体として供給され得る。図2Bは、それらに配置される、ヒーター挿入体128を有する反応チャンバー104の例を示す。抵抗ヒーターは典型的には、そのヒーターを通して電流を適用するための調節された電源に電氣的に連結される。電源の調節は典型的には、適切にプログラムされたコンピューターにより実施される。上記ヒーターは、反応チャンバー内に抵抗金属フィルム又は挿入体を付着することによって個々の反応チャンバー内に組込まれ、又は他方では、特定の反応チャンバー隣接して装置の外部に適用され得、それにより、ヒーターからの熱が反応チャンバー中に伝えられる。

温度調節された反応チャンバーはまた、典型的には、チャンバーの温度をモニターするためのミニチュア温度センサーを包含し、そしてそれにより、ヒーターを通しての電流の適用を調節する。広範囲の種類のマイクロセンサー、たとえば温度依存性起電力(EMF)を生成する二金属接点を有するサーモカップル、材料の

温度に比例して電気抵抗を有する金属を含む抵抗温度計、サーミスタ、IC温度センサー、石英温度計及び同様のものが、温度を決定するために利用できる。Horowitz and Hill, The Art of Electronics, Cambridge University Press 1994 (2nd Ed. 1994) を参照のこと。本発明の装置に特に適合される1つのヒーター／センサーデザインが、1995年9月28日出願されたアメリカ特許出願番号08/535,875号(引用により本明細書中に組込まれる)に記載される。反応チャンバー内の反応パラメーター、たとえば温度の調節は、手動的に行なわれるが、しかし好ましくは、適切にプログラムされたコンピューターを通して行なわれ得る。特に、温度センサーにより測定される温度及び電源のための入力とは典型的には、アナログ／デジタル／デジタル／アナログ (AD/DA) 変換器を通してこのデータを受容し、そして

記録するようプログラムされるコンピューターによりインターフェース結合されるであろう。同じコンピューターは典型的には、反応チャンバーの温度を高め、そして低めるための適切な電流の供給を指図するためのプログラミングを包含するであろう。たとえば、コンピューターは、予備決定された時間／温度プロフィール、たとえばPCRのための温度サイクル及び同様のものを通して反応チャンバーを取るようプログラムされ得る。本発明の装置のサイズが与えられる場合、反応チャンバーの冷却は典型的には、周囲温度への暴露を通して生じるが、しかしながら、追加の冷却要素、たとえば冷却液システム、ベルティエ冷却器、水浴、等が所望により、包含される。

流体輸送及び温度調節要素の他に、装置中の1又は複数の反応チャンバーかまた、混合機能を組込むことができる。多くの反応チャンバーのためには、混合は、サンプルの特定の反応チャンバー中への及びそのチャンバーからの出し入れをポンプで行なうことによつてのみ行なわれ得る。しかしながら、多くの場合、単一の反応／分析チャンバー、たとえばPCR 増幅反応及びハイブリダイゼーション反応内での一定の混合が所望される。

好ましい態様においては、音波混合が、与えられた反応チャンバー内のサンプルを混合するために使用される。特に、PZT 要素(鉛、ジルコニウム及びチタン

含有セラミックから構成される要素)が、図7Aに示されるように、反応チャンバーに隣接する装置の外表面と接触せしめられる。音波に基づく方法に使用するためのPZT要素の議論のためには、Physical Acoustics, Principles and Methods, Vol. I, (Mason ed., Academic Press, 1965)、及びClevite Corpから入手されるPiezoelectric Technology, Data for Engineersを参照のこと。示されるように、PZT要素702は、ハイブリダイ

ゼーションチャンバー706の外表面704と接触している。ハイブリダイゼーションチャンバーは、1つの内表面として、オリゴヌクレオチドアレイ708を含む。この要素への電流の適用は、反応チャンバーに移行される音波振動を生成し、これに基づいて、そこに配置されるサンプルの混合が起こる。この要素の振動は、反応チャンバー内で発生される実質的な対流をもたらす。この混合システムを組込むマイクロ反応チャンバー内に生成される対称混合パターンが図7Bに示される。

装置への要素の不完全な接触(すなわち、結合)は、流体サンプルの不完全な混合をもたらすことができる。結果として、要素は典型的には、要素702と装置704の外表面との間に配置される流体又はゲル層(示されていない)、たとえば水を有するであろう。この流体層は一般的に、反応チャンバーの外表面と接触する1つの表面、及びPZT要素と接触するもう1つの表面を有する膜、たとえばラテックスバルーン内に組込まれるであろう。適切にプログラムされたコンピューター714は、混合の速度及び/又はタイミングを調節するために機能的発生機712及びRF増幅機710を通して、PZT要素への電圧の適用を調節するために使用され得る。

他の観点において、混合は、装置に隣接するコイルに交流を供給することによって振動され得る、装置内への強磁性元素の組込みにより供給され得る。振動電流は、直接的な対流又は音波流のいずれかにより混合をもたらす、装置における磁気粒子の振動運動及び回転をもたらすコイルの中心を通して振動磁場を創造する。

上記要素の他に、本発明の装置は、サンプル調製又は分析を最適化するために



追加の成分を含むことができる。たとえば、電気泳動力は、アレイの表面中に標的分子を引き出すために使用され得る。たとえば、電極は、アレイの表面上に又はアレイの反対表面上に配

置され、又はパターン化され得る。適切な電場の適用は、アレイに対して溶液中の標的物を押したり又は引張ったりするであろう。種々の類似する増強が、本発明の範囲内に包含され得る。

単一の使い捨てユニット内に上記要素のすべてを組込むことがしばしば所望され得るけれども、一般的に、それらが加工されるそれらの要素及び材料のいくつかの価格は、少なくとも部分的に再使用可能なユニットを供給することを好ましくする。従って、特に好ましい態様においては、装置のための種々の調節要素、たとえば温度調節、混合及び流体輸送要素が、再使用可能な基本単位内に供給され得る。

たとえば、特に好ましい態様においては、装置の反応チャンバー部分は、装置を受けるために適合される再使用可能な基本単位と適合され得る。記載されるように、基本単位は、装置内の選択された反応チャンバー内の温度を調節するための1又は複数のヒーターを包含することができる。同様に、基本単位は、混合要素、たとえば本明細書に記載される要素、並びに、装置内にサンプル混合及び輸送を提供するのための減圧又は圧力源を組込むことができる。

例として、その基本単位は、その上に配置された、上記テープの1又は複数の抵抗ヒーターを有する第1表面を含むことができる。ヒーターは基本単位の表面上に位置し、その結果、反応チャンバー装置がその表面に適合される場合、ヒーターは、温度調節が所望される1又は複数の反応チャンバーに隣接する装置の外表面に隣接し、そして好ましくは、前記表面と接触するであろう。同様に、1又は複数の混合要素、たとえば上記音波混合要素はまた、基本単位のこの表面上に配置され、それにより、反応チャンバー装置と適合される場合、その混合要素は、そのような混合が所望される反応／貯蔵／分析チャンバーの外表面と接触する。混合及び加熱の両者が所

望されるそれらの反応チャンバーのためには、散在されたヒーター及びミキサーが、基本単位の表面上に供給され得る。他方では、その基本単位は、反応チャンバーの1つの外表面上に加熱及び他の表面上に混合を供給するために、第1表面からの装置の反対表面と接触する第2表面を含むことができる。

種々の上記要素と共に、その基本単位はまた、典型的には、適切な電源に加熱及び混合要素を連結するための適切な電気接続を包含する。同様に、基本単位はまた、外部電源、圧力／減圧源及び同様のものに反応チャンバー装置自体を連結するためにも使用され得る。特に、基本単位は、装置に対して内部に存在する種々の調節要素のための電力、減圧又は圧力を供給するために装置上の受容コネクター又は受け口中に差し込む、マニホールド、口及び電気接続を供給することができる。たとえば、基本単位への装置の適合は、基本単位における減圧源から、上記のように、装置中に製造される主要減圧マニホールドへの連結を供給することができる。同様に、基本単位は、装置中に加工される電気回路を通して装置内のいくつかの数の操作に電流を供給するために、装置上の補助コネクターに結合する電気コネクターを供給することができる。同様に、適切な接続はまた、装置の種々の操作、たとえば温度、圧力及び同様のものをモニターするためにも供給される。

続くチャンバーにサンプルを移動するために装置内の破裂膜を突き刺すことに依存する流体輸送のための空気マニホールドを使用するそれらの態様のためには、基本単位はまた、典型的には、1又は複数のソレノイドに固定された破裂用ピンを含むであろう。そのソレノイドに固定された破裂用ピンは、基本単位の表面中に製造されるレセプタクル内に配置され、ここで前記レセプタクルは装置上の破裂膜の位置に対応する。前記ピンは、操作中でない場合、基本単

位の表面下に保持される。ソレノイドの活性化は、基本単位の表面上のピンを、破裂膜中に及びそれを通して拡張せしめる。

基本単位の1つの態様の代表的な図が図8に示される。図8に示されるように、基本単位800は、合せ面804を有する本体構造体802を含む。その本体構造体は、基本単位中に組込まれる予定である種々の要素を収容する。基本単位はまた

、その単位内に配置される1又は複数の熱電加熱／冷却要素806を含むことができ、その結果、装置の一部を含む反応チャンバーが基本単位の合せ面に適合される場合、その反応チャンバーは加熱要素に接触して又はすぐ隣接して存在するであろう。上記のように、装置内の流体を移動するための差圧に基づくシステムを用いるそれらの態様のためには、基本単位は典型的には、圧力源口810を通して合せ面に開口する圧力源を包含することができる。基本単位はまた、典型的には、それらのシステムの他の要素、たとえば破裂膜を突き刺すための、ソレノイド812により駆動されるピン814を含むであろう。それらのピンは、典型的には、合せ面804における嵌込み口816内に存在する。基本単位はまた、典型的には、その基本単位への、装置の一部を含む反応チャンバーの適切な適合を確保するために合せ面上に取付け構造体を含むであろう。そのような取付け構造体は一般的に、装置の一部を含む反応チャンバー上の補助構造体に対応する合せ面上に配置される固定ピン又は穴（示されていない）を含む。固定ピンは、適切な方向への反応チャンバー及び基本単位の適合を確保するために、区別的に寸法分類され、そして／又は先細にされ得る。他方、基本単位は、反応チャンバー部分が固定するウェルを含むように加工され得、ここで前記ウェルは、反応チャンバー部分の非対称形状に適合する非対称形状を有する。そのようなデザインは、録音テープカセット及びプレーヤーの製造において使用されるデザインに類似

する。

上記成分の他に、本発明の装置は、分析をさらに促進するために多くの他の成分を含むことができる。特に、サンプル輸送、操作及びモニタリングの多くの作業が、装置の外部の要素により行なわれ得る。それらの要素は、上記基本単位内に組込まれ得、又は装置及び／又は基本単位への追加の付属物として包含され得る。たとえば、外部ポンプ又は流体流れ装置は、装置の種々の操作を通してサンプルを移動するために使用され得、そして／又は混合のためには、温度調節は個々の操作を最大にするために装置に外部から適用され得、そして弁調節はサンプルの流れを方向づけ、そして調節するために外部から操作され得る。しかしながら、好ましい態様においては、それらの種々の操作は、装置内に組込まれるで

あろう。従って、上記成分の他に、本発明の統合された装置は典型的には、サンプル輸送、方向づけ、操作及び同様のもののための多くの追加の成分を組込むであらう。一般的に、これは多くのマイクロポンプ、弁、ミキサー及び加熱要素を含むであらう。

特に有用であるポンプ装置は、当業界において報告されている種々のマイクロ機械処理されたポンプを含む。たとえば、適切なポンプは、圧電スタック及び2つの逆止め弁、たとえばアメリカ特許第 5,277,556号、第 5,271,724号及び第 5,171,132号に記載されるものにより強力化された、又はアメリカ特許第 5,126,022号に記載のような熱空気要素、すなわち一連の複数膜を用いての圧電蠕動ポンプにより強力化された、バルジングダイアフラムを有するポンプを包含する。その特許の個々の開示は、引用により本明細書に組込まれる。公開されたPCT 出願番号W094/05414はまた、微小規模のチャンネルにおける流体の輸送のためへのラム波ポンプの使用を論じている。

鉄流体性流体輸送及び混合システムはまた、本発明の装置中に組込まれ得る。典型的には、それらのシステムは、装置中に配置される鉄流体性物質を組込む。その鉄流体性物質は、磁石の使用により外部から調節され/方向づけされる。特に、鉄流体性物質は、装置を通して、又は装置の個々の操作を通してサンプル流体を押し進めるために選択的に移動され得るバリエーションを提供する。それらの鉄流体システムはたとえば、サンプルがハイブリダイゼーションチャンバーを満たすために体積が十分でない場合、効果的な体積を減じるために使用され得る。不十分なサンプル流体体積は、アレイとの不完全なハイブリダイゼーション及び不完全なハイブリダイゼーションデータをもたらす。その鉄流体システムは、十分に少ない体積でサンプル流体をサンドイッチするために使用される。次に、この小体積は、サンプルがアレイの全表面と接触することを確保する態様で、アレイを通して抜き取られる。鉄流体は一般的に、FerroFluidics Inc., New Hampshire から市販されている。

本発明の装置内への包含のための他の流体輸送機構は、たとえば電気流体力学的ポンプを包含する（たとえば、Richter など., 3rd IEEE Workshop on Micro

Electro Mechanical Systems, February 12-14, 1990 ; Napa Valley, USA ; 及び Richter など., Sensors and Actuators 29 : 159-165(1991) ; アメリカ特許第 5,126,022号 (個々の文献は引用により本明細書に組込まれる) を参照のこと。典型的には、そのようなポンプは、チャンネル又は反応/ポンピングチャンバーの1つの表面を通して配置される一連の電極を使用する。電極を通しての電場の適用は、サンプルにおける核酸の電気泳動的移動をもたらす。インジウム-酸化錫フィルムは、支持体表面、たとえばガラス又は珪素支持体表面上に電極をパターン化するために特に、適切である。それらの方法はまた、アレイ上に核酸を引

き抜くためにも使用され得る。たとえば、電極はアレイ支持体の表面上にパターン化され、そして電極の表面に核酸を結合するために適切な官能基により変性され得る。アレイの表面上の電極と反対側の電極との間での電流の適用は、アレイの表面に向かっての核酸の電気泳動的移動をもたらす。

一時的な電場の適用による電気泳動的ポンピングはまた、十分なサンプル移動を引き起こしながら、電極の表面での電気分解を回避するためにも使用され得る。特に、核酸の電気泳動移動度は、適用される電場により一定ではない。50から400 V/cmの電場の上昇は、アクリルアミドゲルにおける核酸サンプルの移動度の30%上昇度をもたらす。電解質に容量的に結合される1対の電極間への振動電圧の適用により、完全な電気泳動的運動が電荷の完全な通過を伴わないで得られる。たとえば、高い電場がサンプル移動の前方向に適用され、そして低い電場が逆方向に適用される。たとえば、Luckeyなど., Electrophoresis 14 : 492-501(1993)を参照のこと。

上記マイクロポンプはまた、混合されるべき特定のチャンバーを通して再循環流体の流れを方向づけることによって、装置内の試薬及びサンプルを混合するためにも使用され得る。追加の混合方法もまた、使用され得る。たとえば、電気流体力学的ミキサーが、種々の反応チャンバー内に使用され得る。それらのミキサーは典型的には、電荷が導入される流体を移動するために移動電場を用いる。Bartなど., Sensors and Actuators (1990) A21-A-23 : 193-197を参照のこと。それらの混合要素は、ミニチュア化された装置中に容易に組込まれ得る。他方、混

合は熱空気ポンピング機構を用いて行なわれ得る。これは典型的には、特定のチャンバー内の開口部の後ろに配置される小さなヒーターの包含を含む。ヒーターと接触している液体が加熱される場合、それは開口部を通して拡張し、チャンバ

ーへの対流力の導入を引き起こし、それによって、サンプルを混合する。他方、2つの一元逆止め弁の後ろに保持されるポンピング機構、たとえばアメリカ特許第 5,375,979号 (Trah; 引用により本明細書に組込まれる) は、チャンバー内の流体サンプルを循環するために使用され得る。特に、流体は、ポンプがその減圧又は引き込みサイクル下で操作される場合、第1の一元逆止め弁を通してポンピングチャンバー中に引き込まれる。次に、流体は、逆のポンプサイクルの間、もう1つの一元逆止め弁を通してポンプチャンバーから追い出され、反応チャンバー内での循環流体の流れをもたらす。ポンピング機構は、本明細書に記載されるようないづれかの数のデザイン、すなわちダイアフラム、熱圧力、電気流体力学、等を使用することができる。

成分の表面でのサンプルの電気分解を妨げるために、流体サンプルと接触することができる装置の電気成分を絶縁することが、典型的には所望されるであろう。一般的に、いづれかの数の非導電性絶縁材料、例えばテフロン被膜、 $\text{SiO}_2$ 、 $\text{Si}_3\text{N}_4$  及び同様のものが、この機能のために使用され得る。好ましくは、絶縁層は $\text{SiO}_2$ であり、これは一般的に、絶縁層を供給するために成分の表面上に散在され得る。

本発明の装置はまた、典型的には、装置内の流体の流れの方向づけのために多くのマイクロ弁を組込むであろう。種々のマイクロ弁デザインが、本発明の装置のために特に十分に適合される。装置に使用され得る弁の例は、たとえばアメリカ特許第 5,277,556号 (van Lintel; 引用により本明細書に組込まれる) に記載されている。本発明の装置への使用のための好ましい弁構造体は典型的には、弁座上に偏向され得る膜又はダイアフラムを組込んでいる。たとえば、静電弁、珪素/アルミニウム二金属作動弁又は熱空気作動弁が、

本発明の装置への組込みのために容易に適合され得る。典型的には、それらの弁

は、種々の反応チャンバーを連結する流路の一端又は両端内又はそれらの端で組込まれ、そして種々の操作において使用される圧力又は試薬に対して耐性であろう。ダイヤフラム弁／流路の構成の態様の例示が、図3に示されている。

他の観点においては、流体弁がまた使用され得る。そのような流体弁は典型的には、装置に使用される水性システム、たとえばシリコン油、鉄流体及び同様のものにおいて不混和性である液体を含んで成る“液体カーテン”を包含する。操作においては、流体弁は、より深い一次チャネル、たとえば合せ平面メンバーにおいて  $200\mu\text{m}$  の深さのチャネルを横切って配置され、そしてそのチャネルを中断する、 $50\mu\text{m}$  の深さの狭い弁付きチャネルを包含する。その弁付きチャネルは、少なくとも1つの油入口に連結される。操作においては、その弁付きチャネルは、まず油（又は他の適切な流体要素）により満たされ、これが毛管作用によりチャネル中に引き込まれる。ガス又は液体が一次チャネルを通して押し進められる場合、油又は“流体カーテン”が片側に移動し、そして通過を可能にする。一次チャネルにそっての差圧の不在下においては、油が、蒸気バリアーの後ろに流体又はガスを封止するために戻るであろう。そのような場合、それらの流体弁は、装置内の流体サンプル又は試薬の蒸発の防止に有用である。さらに、他の流体、たとえば鉄流体、又は懸濁された金属粒子を有する油の場合、弁位置での適切な磁場の適用が流体弁を固定し、それにより、 $3\sim 5\text{psi}$  よりも高い圧力で流体の通過を阻止する。同様に、電気流動学的効果がまた、それらの流体弁を調節することにも使用され得る。たとえば、流体弁の油部分は、高い誘電率を有する適切な粒子をそこに懸濁している。次に、適切な電場の適用は流体の粘度を高め、それにより、流体の流れ

に対して適切なバリアーを創造する。

装置はまた、サンプルから細胞残骸及びタンパク質固形物を除去するために1又は複数のフィルターを組込むことができる。そのフィルターは一般的に、装置内に、たとえばサンプル調製／抽出チャンバーから導びく流体通路内に存在することができる。種々の良く知られたフィルター媒体、たとえばニトロセルロース、ポリスルホン、ナイロン、ビニル／アクリルコポリマー、ガラス繊維、ポリビ

ニルクロリド及び同様のものが装置中に組込まれ得る。他方、フィルターは、アメリカ特許第 5,304,487号 (Wildingなど.; 引用により本明細書に組込まれる) に記載される装置に類似する装置に加工される構造体であり得る。同様に、分離用媒体、たとえばイオン交換樹脂、親和性樹脂又は同様のものを有する分離チャンバーは、汚染タンパク質、等を除去するために装置内に含まれ得る。

温度をモニターするためのセンサーの他に、本発明の装置はまた、装置の1又は複数の操作の進行をモニターするために装置自体内に1又は複数のセンサーを含むことができる。たとえば、光学センサー及び圧力センサーが、種々の反応の進行をモニターするために1又は複数の反応チャンバー中に、又は流体の進行をモニターし、又は流体の特徴、たとえばpH、温度、蛍光及び同様のものを検出するために流路内に組込まれ得る。

前で記載されたように、装置内に統合された個々の操作に使用される試薬は、たとえば個々のそれぞれのチャンバーにおける封止可能開口部を通して装置中に外部から導入され得る。しかしながら、好ましい観点においては、それらの試薬は装置内に前もって配置されるであろう。たとえば、それらの試薬は、その試薬が使用される操作を行なう反応チャンバー内に、又はその反応チャンバーに導びく流路内に配置されるであろう。他方、試薬は、それらのそれぞれ

の反応チャンバーに隣接し、そしてそれに流体的に連結される貯蔵チャンバー内に配置され、それにより、試薬は必要な場合、適切なチャンバーに容易に輸送され得る。たとえば、増幅チャンバーは典型的には、増幅反応を実施するための適切な試薬、たとえば増幅チャンバー内に前もって配置された、プライマープローブ配列、デオキシヌクレオシド三リン酸 (“dNTP”)、核酸ポリメラーゼ、緩衝剤及び同様のものを有するであろう。同様に、サンプル安定化試薬は典型的には、サンプル収集チャンバー内に前もって配置されるであろう。

## 2. 遺伝子サンプル調製装置

図13は、一般的に、本明細書に記載される流体方向づけシステムを用いての、たとえば外部圧力、疎水性バント及び空気弁を用いての、サンプル調製反応を実施するための装置形状の図示である。示される形状においては、装置の4種のド



メインが、それ自体の共通チャネルを伴って、一連の弁、たとえば10個の弁アレイにより個々に扱われている。前記4種のドメインは一般的に次のように定義され得る：(1) 試薬貯蔵；(2) 反応；(3) サンプル調製；及び(4) 後一処理（それらは流体的に相互連結されている）。サンプル調製ドメインは典型的には、サンプルから核酸を抽出し、そして精製するために使用される。示されるように、サンプル調製ドメインは、たとえば基本単位内で、大きな容積の貯蔵容器に流体的に連結される5種の試薬入口が含まれる。抽出反応のためのそのような試薬の例は、たとえば4 Mのグアニジンイソチオシアネート、1×TBE 及び50：50のEtOH：H<sub>2</sub>O を包含する。2種の反応チャンバーは、たとえば核酸の精製のための親和性媒体、たとえばガラスウール、又はポリ-Tオリゴヌクレオチドにより被覆されたビーズを含むことができる。

貯蔵ドメインはサンプル調製ドメインに連結されており、そして試薬及び混合物、たとえばFITC-dGTP及びdUTPを有するが、しかし鋳型を有さないPCR 混合物、UNG 反応混合物及び鋳型を有さないIVT 反応混合物の貯蔵のために使用される。反応ドメインはまた、サンプル調製ドメイン及び貯蔵ドメインにも連結されており、そして多くの反応チャンバー（5）、測定チャンバー（2）及び脱泡チャンバー（1）を含む。サンプル調製及び反応ドメインの両者は、熱コントローラー、たとえばヒーター、又は熱電ヒーター／クーラーにより調節され得る。

後一処理ドメインは典型的には、反応ドメインに連結され、そして多くの試薬入口（5）、反応チャンバー（2）、貯蔵チャンバー（1）及びサンプル入口（1）を含む。試薬入口は、分析要素、たとえばオリゴヌクレオチドアレイ中に緩衝液、たとえば6×SSPE又は水を導入するために使用され得る。

### 3. 一般的な複数類似システム

図14は、次のいくつかの反応が同じ熱条件で実施される予定である情况进行処理するための装置の形状の図示である：複数の類似サンプル分析、同時に単一のプライマー対とのいくつかのPCR 反応を行ない、続いてそれらを組換えることによる重複する複数のPCR、又は種々のプライマー対及び／又は鋳型による循環配列決定。

示されるようなこの形状においては、2種の貯蔵ドメインが2種の反応ドメインに試薬を供給し、個々のドメインは一連の50の弁により扱われている。反応及び貯蔵アレイは個々に、反応器／チャンバーの4×12のマトリックスを含んで成り、個々は10nl～5µlの体積である。それらのチャンバーは、それぞれ空気口を有する4種のカラムにより処理される。10個の弁を有する2種の追加のアレイは、サンプル調製及び後処理ドメインを扱う。一連のソレノイ

ド弁が、空気口及び弁アレイを駆動するために使用され得る。

#### IV. 用途

本発明の装置及びシステムは、核酸サンプルの操作、同定及び／又は配列決定において広範囲の種類用途を有する。それらのサンプルは、植物、動物、ウィルス又は細菌源に起因することができる。たとえば、本発明の装置及びシステムは、診断用途、たとえば遺伝子障害の診断、及び感染性物質、たとえば細菌又はウィルス感染の存在の診断に使用され得る。さらに、装置及びシステムは種々の特徴化用途、たとえば法的分析、たとえば遺伝子フィンガープリント、細菌、植物又はウィルス同定又は特徴化、たとえば疫学的又は分類学的分析、及び同様のものに使用され得る。

個々の装置に関して一般的に記載されているが、複数の装置が多数の個々のサンプルに対しての分析を行なうために同時に供給されることは理解されるであろう。装置はミニチュア化されるので、試薬及び／又は空気必要条件は実質的に減じられる。同様に、小さなサイズは、たとえばロボットサンプラー及び同様のものを用いてのサンプル導入方法の自動化を可能にする。

好ましい観点においては、本発明の装置及びシステムはヒトサンプルの分析において使用される。より特定には、装置は、特定のヒトサンプル内の特定の核酸配列の存在又は不在を決定するために使用される。これは、特定の疾病に関連する遺伝子異常の同定、及び特定の感染物質、たとえばウィルス、細菌、酵母又は菌類のサンプル内の同定を包含する。

本発明の装置はまた、新規の配列決定用途にも使用され得る。特に、装置は、ハイブリダイゼーション(SBH)技法による配列決定に使用され得る。新規SBH用

途へのオリゴヌクレオチドアレイの使用は、たとえば1993年6月25日に出願されたアメリカ特許出願番号08

/082,937に記載される。

#### 例

##### 例1—核酸の抽出及び精製

別々の実験において、HIV クローン化されたDNA を、ウマ血液、又はネズミブラズマ細胞腫、すなわちBALBC マウス由来の十分に分化されたB-細胞の懸濁液のいずれか中にスパイクした。グアニジンイソチオシアネートを添加し、4 Mの濃度にし、前記材料を溶解した。別々の実験において、前記溶解物を、ガラスウール ( $20\mu\text{l}$ ) を含むカートリッジ、ソーダガラス壁 ( $20\mu\text{l}$ ) を有するカートリッジ、及びガラス管に通した。室温で30分後、残る溶解物を、エタノール：水 (1：1) により数回洗浄し、そして捕獲されたDNA を1×TBE を用いて60℃で溶出した。溶出されたDNA の収率を、アガロースゲル上での臭化エチジウム染色を用いて測定し、そして純度をPCR 反応のための鑄型として溶出された材料を用いて試験した。純粋な鑄型を用いての対照に比較して、溶出の収率は、10%～25%の範囲であり、そしてPCR 収率は90～100%の範囲であった。

##### 例2—ミニチュア化されたシステムにおけるRNA 調製反応

ミニチュアモデル反応器システムは、標的核酸に対するプレハイブリダイゼーション調製反応を実施することにおけるミニチュア化された装置の効能を調査するために企画された。特に、インビトロ転写及び断片化を実施するための二重反応チャンバーシステムを加工した。装置は、ガラス細管断片化反応器に結合されるインビトロ転写反応器としてポリマー管を用いる、管に基づく構造体を使用した。サンプルと共に導入されない試薬は、連結管の内面上に乾燥された付着物として供給された。この実験は、RNA 調製反応チャンバーにおける反応チャンバー材料及び反応体積の効果を調査するために企画された。

標的核酸を含むサンプル、それぞれ、センス及びアンチセンス鎖に対するT3及びT7 RNAプライマーのためのプロモーター領域を両端に有するHIV 遺伝子の

1 kb部分を含むDNA アンプリコン、RNA ポリメラーゼ、NTP、弗素化されたUTP 及び緩衝液も、管に基づくシステム的一端で反応器システム中に導入した。インビトロ転写を、水浴に含浸されたシリコン管反応器において実施した。この初期反応に続いて、サンプルを、システムを通して、94℃で維持されるガラス細管反応器中に、断片化反応を実施するために移動した。代表的な時間経過断片化反応の生成物が、図10Aのゲルにおいて示されている。多くの場合、断片化反応器にIVT 反応器を連結する管は、サンプルへの添加のために追加の $MgCl_2$ を含んだ。ガラス細管をまず、BSAにより被覆し、サンプルとガラスとの間の相互反応を回避した。断片化に続いて、サンプルを、上記のようにして、適切に被覆されたオリゴヌクレオチドアレイによりハイブリダイズせしめた。14mMの $MgCl_2$ 添加を伴ってのこのシステムを用いての調製は、96.5%の正しい基本コールレートをもたらした。 $MgCl_2$ の削除は、95.5%の正しい基本コールレートを付与した。

類似する予備転写反応を、ポリカーボネートで加工されたマイクロ反応チャンバーにおいて実施した。第1のポリカーボネート部分の表面におけるウェルを機械処理した。ウェルは  $250\mu m$  の深さであり、そして  $5\mu l$  のおよその体積を有した。第2のポリカーボネート部分を、第1の部分に音波的に溶接し、反応チャンバーのための上壁を供給した。その第2部分は、それを通して孔開けされた2つの穴を有し、それらの穴は、反応チャンバーの反対端に位置していた。転写反応のための温度調節は、管に基づくシステムについて記載されるように、反応チャンバーに外部温度調節を適用することによって供給された。 $3\mu l$  のサンプルを、転写及び断片化実験

のために用いた。

マイクロ反応器において行なわれる転写反応は、従来の方法に比較して70%の収率、たとえば、マイクロ遠心管及び水浴又はPCR 熱サイクラーにおいて同じ体積を達成した。マイクロチャンバー対大規模の対照を用いてのインビトロ転写反応生成物の比較が図10Bに示される。

### 例3—ミニチュア化されたシステムにおけるPCR 増幅

例2に記載されるチャンバーと類似するミニチュアのポリマー性反応チャンバ

ーを、PCR 増幅を行なうために使用した。特に、チャンバーは、4 mmの厚さのポリカーボネートの平らな断片から加工され、そしてその表面中に機械処理された  $500\mu\text{m}$  の深さの穴を有した。第2の平らなポリカーボネート断片を、前記穴上に溶着した。この第2の断片はわずか  $250\mu\text{m}$  の厚さであった。熱調節は、前記穴のより薄い第2壁に対してペルティエヒーターを適用することによって供給された。

標的核酸の増幅を、Perkin-Elmer GeneAmp® PCRキットにより行なった。反応チャンバーを、 $94^{\circ}\text{C}$  で20秒（変性）、 $65^{\circ}\text{C}$  で40秒（アニーリング）及び $72^{\circ}\text{C}$  で50秒（拡張）間、循環した。その熱循環のプロフィールは図9に示される。約 $10^9$ の増幅が、35回の循環の後に示された。図10Cは、典型的なPCR 熱サイクラーを用いての対照に比較して、マイクロチャンバーにおける増幅された生成物の生成を示す。

#### 例4—システムの事例、統合された反応

図15Aに示される構造を有する、マイクロ加工されたポリカーボネート装置を製造した。その装置は、3つの別々のベント式チャンバーを包含した。チャンバーの2つ（上部及び中間部）は、PCR 温度でIVT 反応に使用されるRNA ポリメラーゼのいずれかの変性を阻

止するために、PCR チャンバー（低部）から熱的に単離された。熱単離は、薄ポリカーボネート支持体において10mm以上；お互い離れてチャンバーを加工し、そして熱電温度コントローラー、たとえばペルティエ装置の使用を通して個々の領域における温度を調節することによって達成された。

反応装置の寸法は次の通りであった：チャンネルは  $250\mu\text{m} \times 125\mu\text{m}$ （幅×深さ）であり；3個の反応チャンバーは  $1.5\text{mm} \times 13\text{mm} \times 125 \sim 500\mu\text{m}$ （幅×長さ×深さ）であり、そして反応器の体積は  $2.5 \sim 10\mu\text{l}$  であった。手短に言及すれば、PCR は、底部チャンバー中に、0.3単位のTaq ポリメラーゼ、0.2mMのdNTP、1.5mMの $\text{MgCl}_2$ 、 $0.2\mu\text{m}$ のプライマー配列、鋳型配列の約2000個の分子、及び  $1 \times$  Perkin-Elmer PCR緩衝液を導入することによって行なわれた。熱循環プログラムは次のものを包含した：（1） $94^{\circ}\text{C}$  で60秒間の初期変性、（2） $94^{\circ}\text{C}$  で20秒

間の変性段階、(3) 65℃で40秒間のアニーリング段階、(4) 72℃で50秒間の拡張段階、(5) 段階2～4の循環の35回の反復、及び(6) 72℃で60秒間の最終拡張段階。

PCR に続いて、PCR 生成物  $0.2\mu\text{l}$  を、次のものと共に、IVT チャンバー (中間) に移した: 貯蔵チャンバー (上部) において貯蔵されている  $9.8\mu\text{l}$  の IVT 混合物 (2.5mM の ATP, CTP, GTP 及び 0.5mM の UTP, 0.25mM のフルオレセイン-UTP, 8mM の  $\text{MgCl}_2$ , 50mM の HEPES,  $1\times$  Promega 転写緩衝液、10mM の DTT, 1 単位の T3 DNAポリメラーゼ、0.5 単位の RNA guard (Pharmacia) )。流体移行を、チャンバーの端でベントに圧力を適用することによって実施した。IVT は、37℃で60分間、行なわれた。

PCR 及び IVT の結果は、たとえばエペンドーフ管において行なわれた対照実験に比較して、図15B に示される。

#### 例5 - 音波混合

反応チャンバーの内容物を混合するための音波要素の効能を試験した。PZT-5 H の  $0.5'' \times 0.5'' \times 0.04''$  結晶を、PZT 要素の反対表面において機械処理された穴を有するデルリンの平らな断片の  $0.030''$  厚さの領域の外表面に結合した。平らなシリカ支持体上で合成されたオリゴヌクレオチドアレイを、ゴム製ガスケットを用いて前記穴上に封止し、その結果、その上で合成されたオリゴヌクレオチドプローブを有するアレイの表面が前記穴に暴露され、 $250\mu\text{l}$  の反応チャンバーを生成した。PZT 結晶が、1 Hz で作動される第2機能発振機によりゲートを付けられた、Hewlett Packard からの機能発振機により駆動される、ENT200 High Frequency Power Supplyにより押し流がされた。

初期試験においては、チャンバーは脱イオン水により満たされ、そして少量の2%ミルクが可視化のために注入された。結晶を3Wの平均電力を伴って2MHzで押し流した。チャンバー内の流体速度が、 $1\text{mm}/\text{秒}$  以上であることが評価され、これは有意な対流を示す。この対流を示す写真が図7Bに示されている。

音波混合の効能をまた、実際のハイブリダイゼーションプロトコールで試験した。このハイブリダイゼーション試験のためには、配列5'-GAGATGCGTCCGTGGCT

G-3'を有する蛍光ラベルされたオリゴヌクレオチド標的配列、及びそこで合成されるこの配列に対する補体を有する  $400\mu\text{m}^2$  のチェックカードパターンを有するアレイが使用された。6×SSPE中、標的物の10nM溶液のハイブリダイゼーションを実施した。ハイブリダイゼーションの間、アレイの外表面は、15℃で設定された熱電クーラーと接触して維持された。ハイブリダイゼーションを、4 Wの平均電力で2 MHz で結晶を押し流しながら、20分間、行なった（オンタイム=0.2 秒、オフタイム=0.8 秒）。その得られる平均強度は、チャンバーの機械的混合（組込まれ

る気泡による垂直回転）を用いて達成される強度と同一であった。

蛍光ラベルされ、そして断片化された、HIV ウィルスの1 kb部分を用いての追加の実験は、好結果をもたらす塩基のコールレートを有した。特に、1 kbのHIV 核酸セグメントを、HIV 被覆されたオリゴヌクレオチドアレイ又はチップを用いて配列決定した。1994年8月2日に出願されたアメリカ特許出願番号08/284,064（引用により本明細書に組込まれる）を参照のこと。音波混合は、機械混合の95.8%の正しい塩基コールレートに比較して、90.5%の正しい塩基のコールレートを達成した。

#### 例5－流体方向づけシステムの例示

ポリカーボネートカートリッジを、従来の機械処理を用いて加工し、一連の10  $\mu\text{l}$  のチャンバーに導びく一連のチャンネルに通常のチャンネルを連結する一連の弁を形成し、ここで個々のチャンバーは疎水性ベントで停止された。チャンバーは次のものを包含した：（1）入口チャンバー# 1、（2）入口チャンバー# 2、（3）反応チャンバー、（4）中心に疎水性ベントを有する脱泡チャンバー、（5）測定チャンバー、及び（6）貯蔵チャンバー。エラストマー弁は、個々の弁上の空間に減圧又は圧力（約60psi）の適用により開放され、そして閉鎖された。

第1の実験においては、青色の色素（食品の着色剤）を含む水を、入口チャンバー# 1に導入し、そして黄色の色素（食品の着色剤）を含む水を入口チャンバー# 2に導入した。適切な弁を開放し、そしてその弁に5 psi の圧力を適用することによって、次の一連の流体の移動が行なわれた：青色の水は入口チャンバー

# 1 から反応チャンバーに移動され；黄色の水は入口チャンバー # 2 から貯蔵チャンバー # 6 に移動され；青色の水は反応チャンバーから測定チャンバーに移動され、そして残る青色の水は入口チャンバー # 1 に排

出され；測定された青色の水（約  $1.6\mu\text{l}$ ）は、測定チャンバーから脱泡チャンバーに移動され；黄色の水は貯蔵チャンバーから脱泡チャンバーに移動され、これに基づいて、それは青色の水と連結し、そして混合するように見え、緑の色を生成し；そして最終的に、その混合物は脱泡チャンバーから反応チャンバー及び次に、貯蔵チャンバーに移動された。

脱泡チャンバーの機能が、反応チャンバーから脱泡チャンバーに着色された水の4種の異なったプラグを移動することによって示された。個々のプラグが、脱泡チャンバー中への通過に基づいて、単一の流体プラグとして一緒に連結した。

測定チャンバーの機能が、 $10\mu\text{l}$  の着色された水サンプルの一部を、貯蔵チャンバーから測定チャンバーに動かし、続いて、この流体を、測定チャンバーから排出することによって示された。この流体の移行は6回行なわれ、これは、測定チャンバーの体積当たり約  $1.6\mu\text{l}$  の反復された等分化を示す（6回のアリコートにおいて $10\mu\text{l}$ ）。

前述の発明は明確性及び理解の目的のためにいくらか詳細に記載されて来たけれども、種々の変更が本発明の範囲内で行なわれ得ることは、当業者に明らかであろう。本出願に引用されるすべての出版物及び特許記録は、引用により本明細書に組込まれる。



【図1】

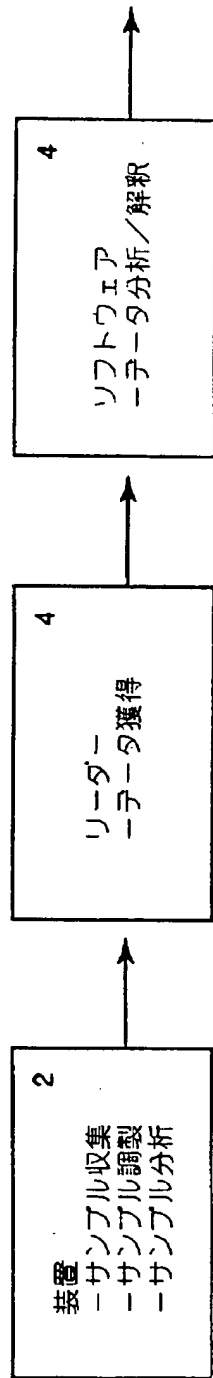


Figure 1

【図2】

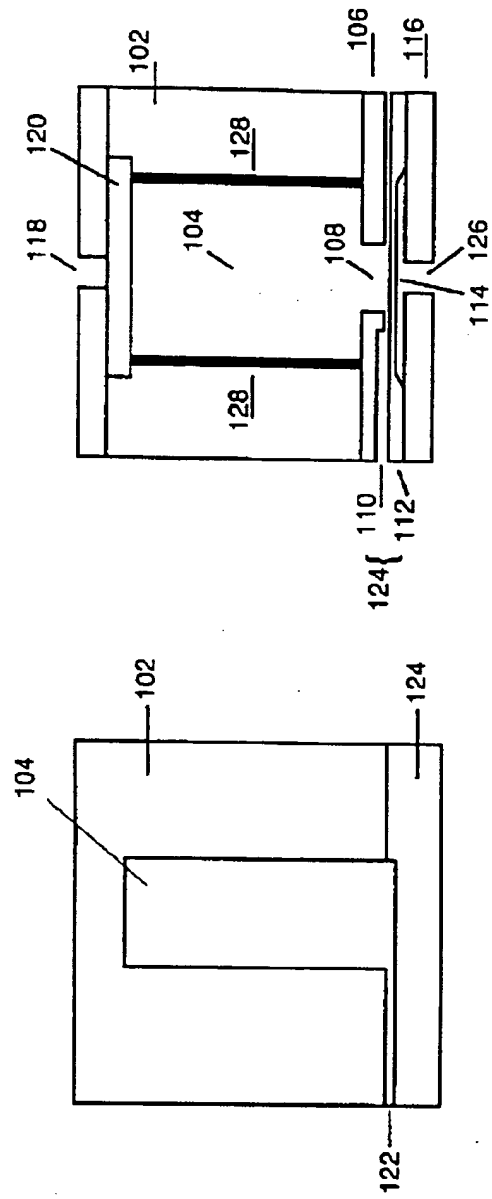


Figure 2a

Figure 2b

Figure 2a & 2b

【図3】

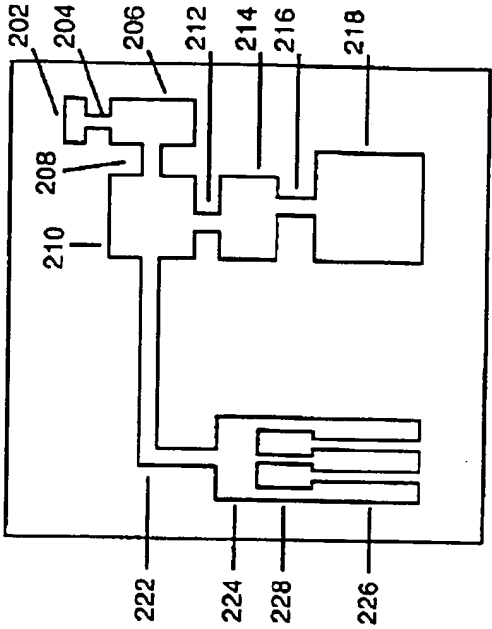


Figure 3

【図 4】

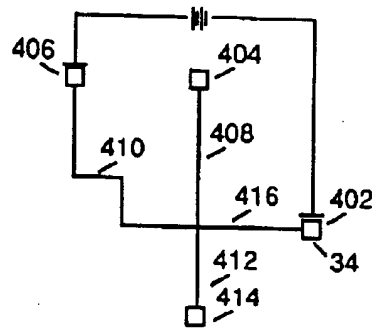


Fig. 4a

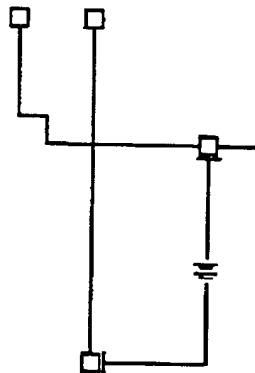


Fig. 4b

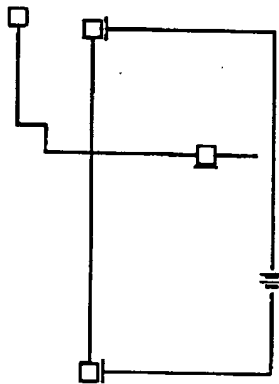


Fig. 4c

Figure 4a-4c

【図 5 a】

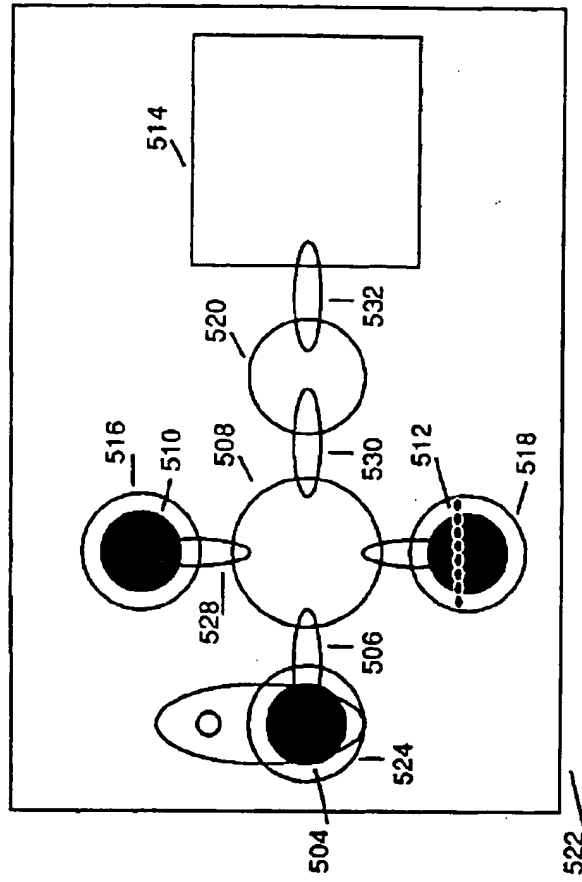


Figure 5a

【図5】

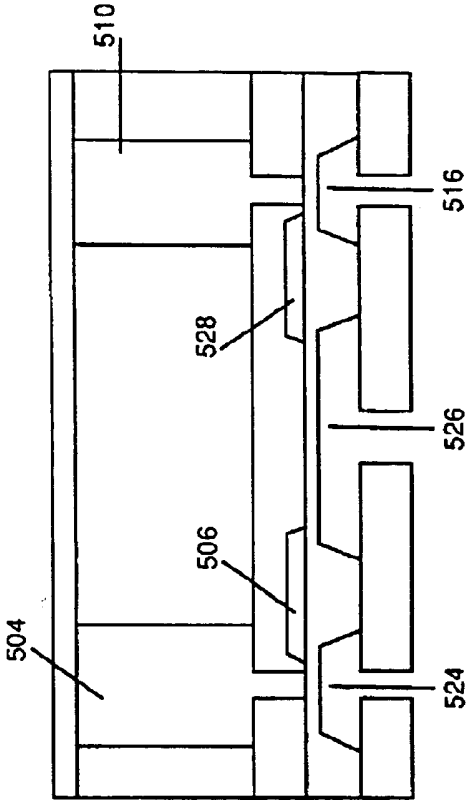


Figure 5b

【図 6】

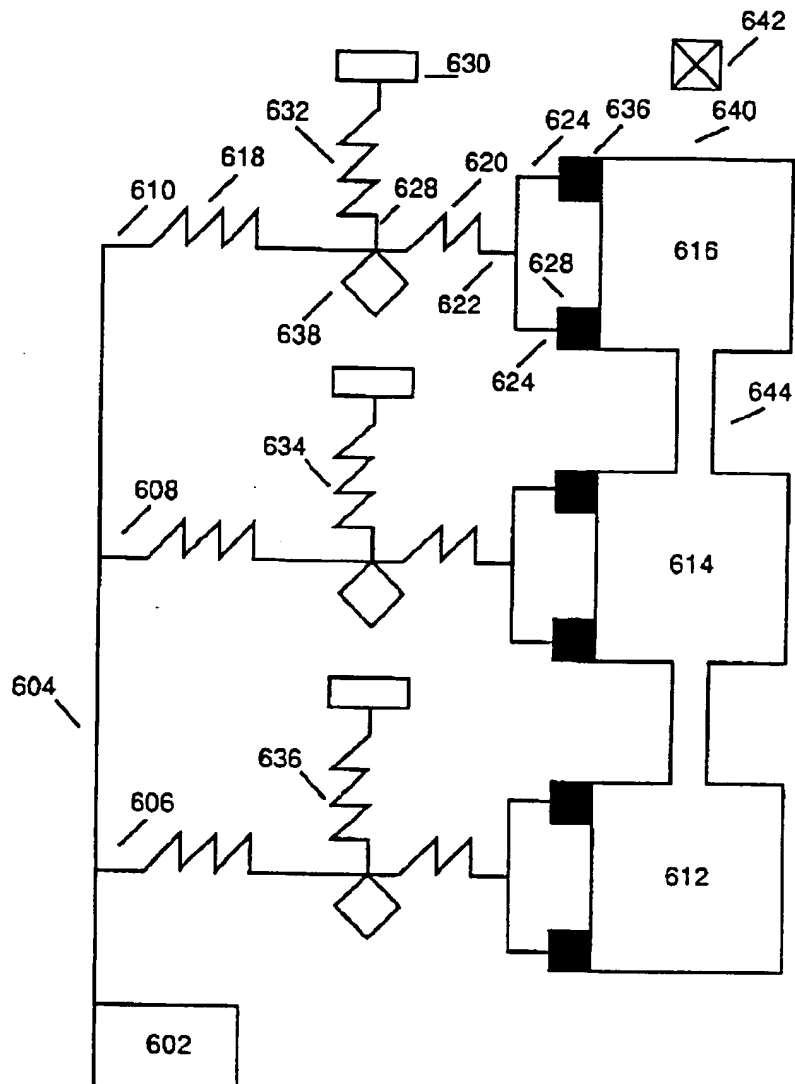


Figure 6a

【図6】

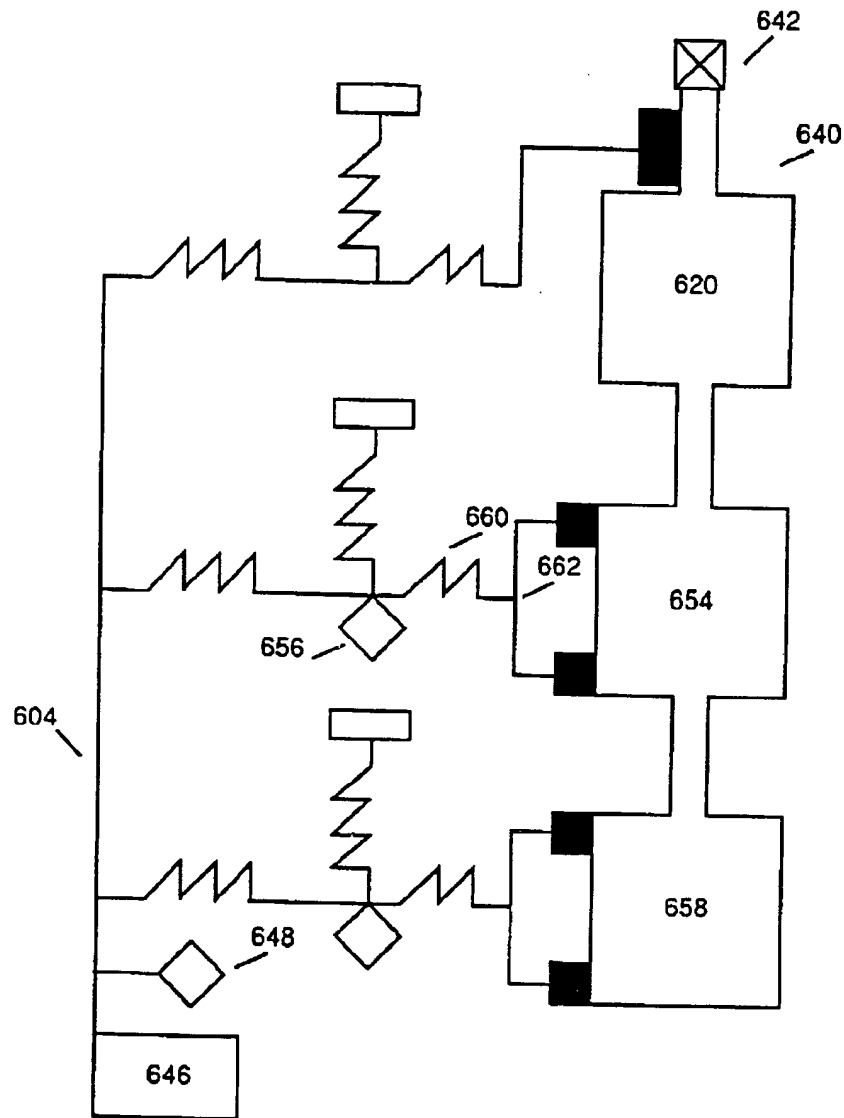


Figure 6b



【図6】

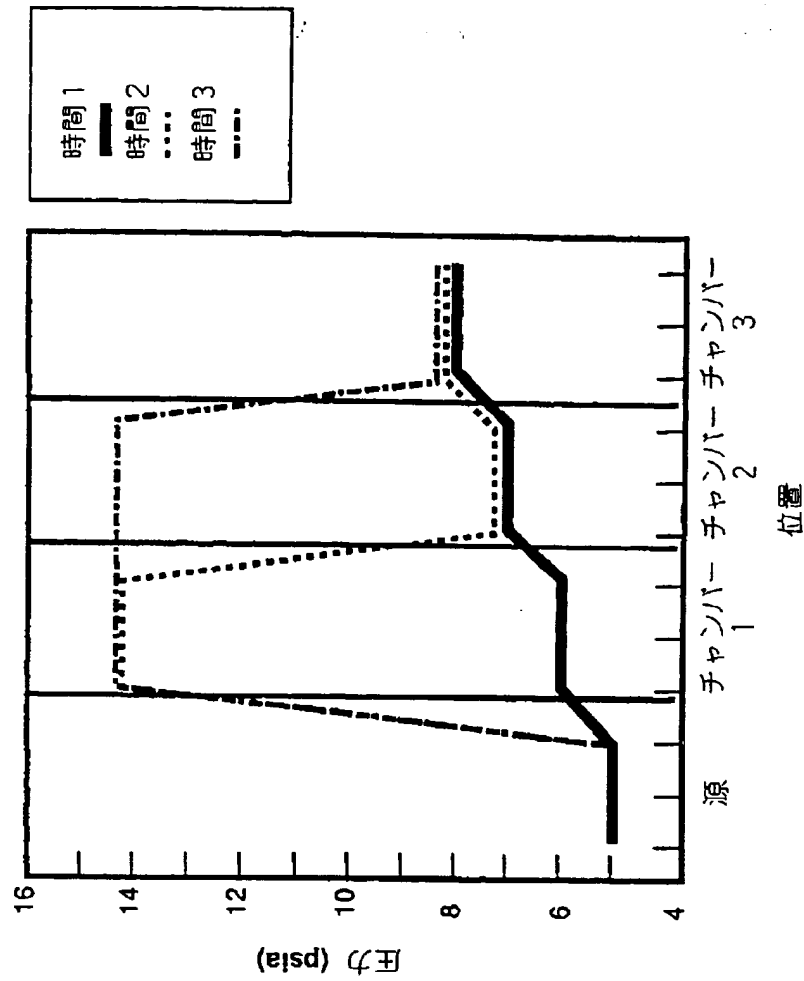


Figure 6c

【図7】

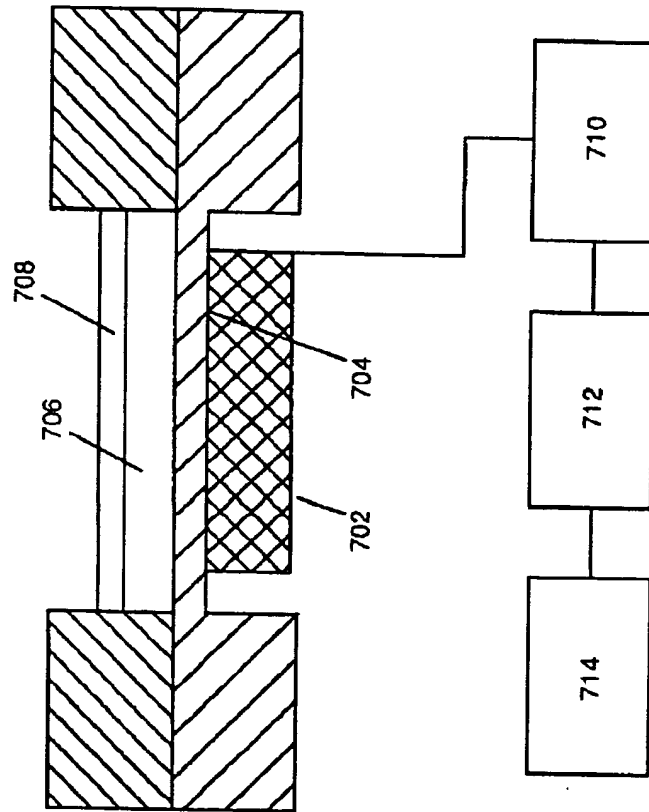


Figure 7a

【図7】

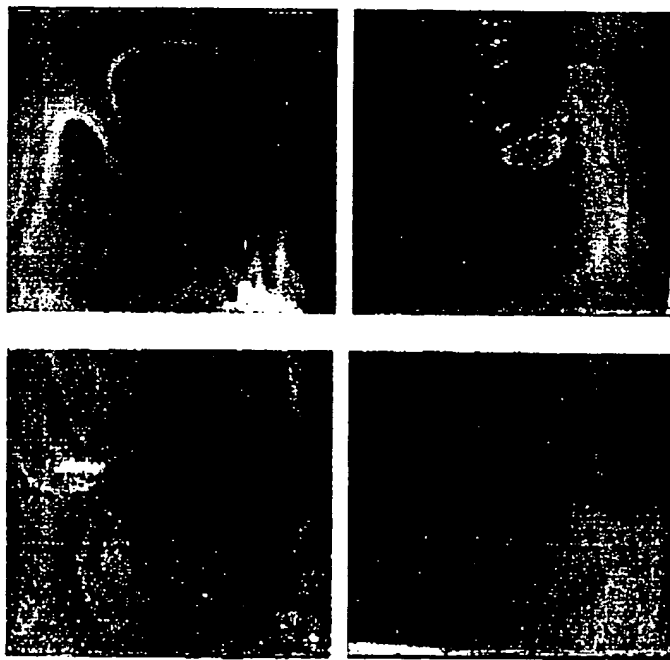
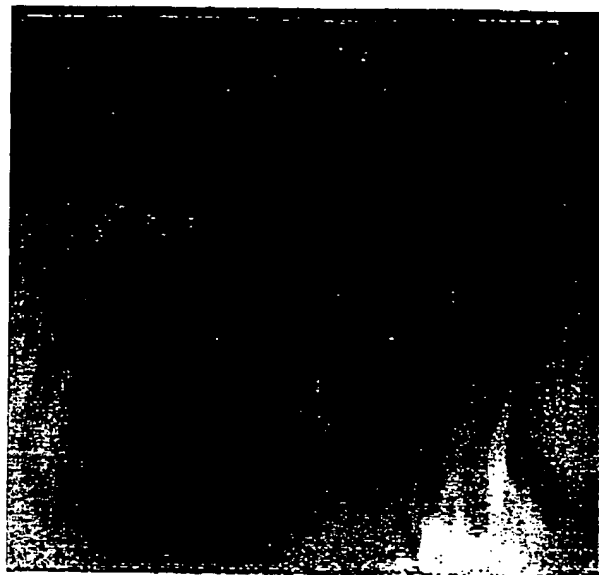


Fig. 7B

【図7】

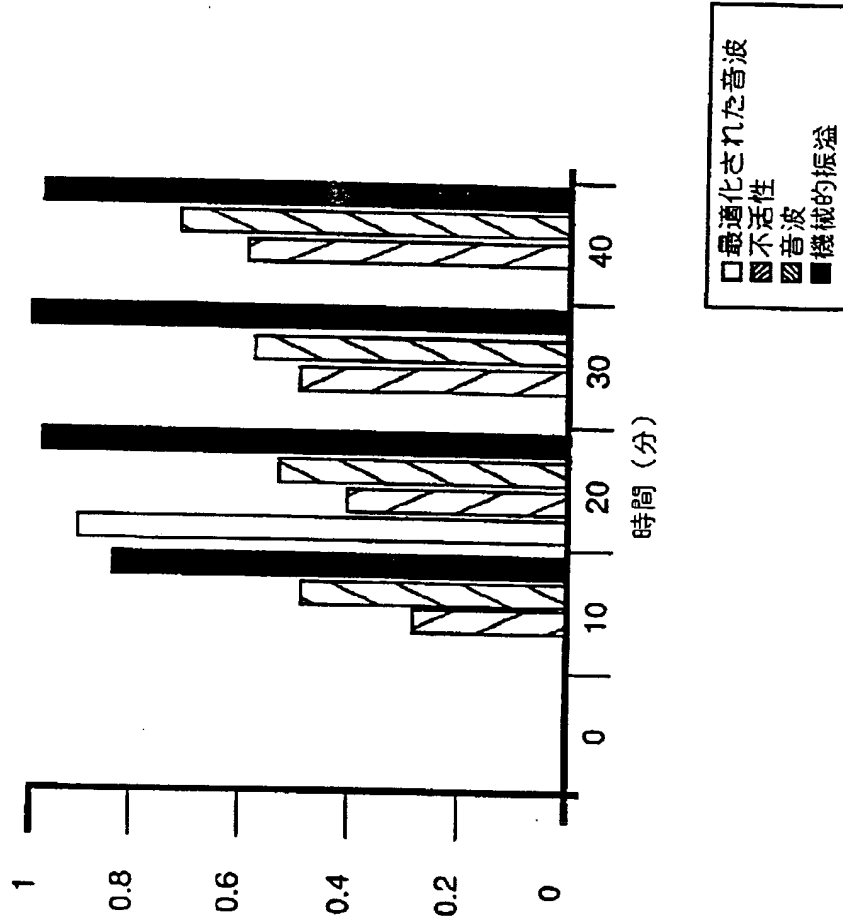


Figure 7c

【図 8】

800 ↗

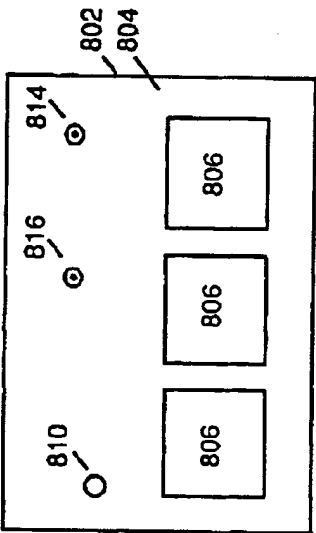


Fig. 8b

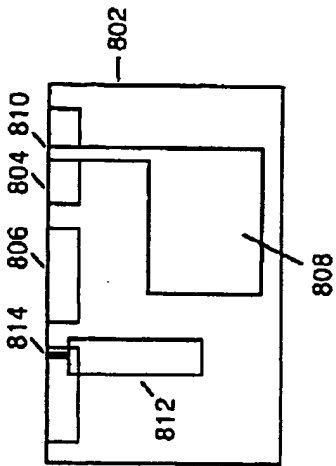


Fig. 8a

Figure 8a & 8b

【図9】

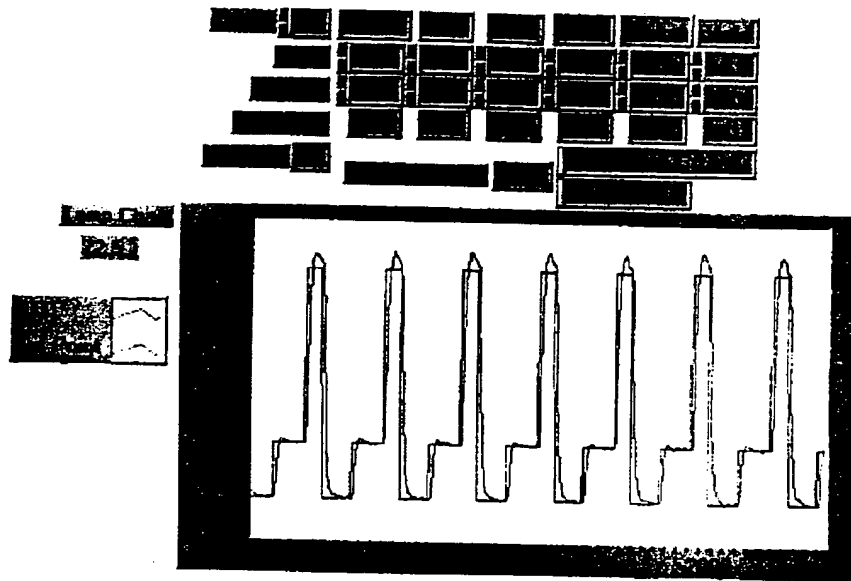
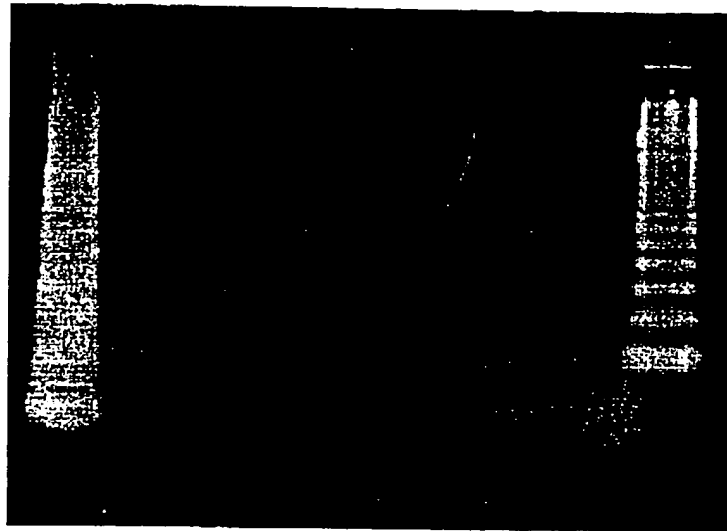


Fig. 9

【図10】

t = 0 5 10 30 60 120 分



正しいコールレート;

74%	95.8%	95.9%
95.9%	95.5%	83%

Fig. 10A

【図10】

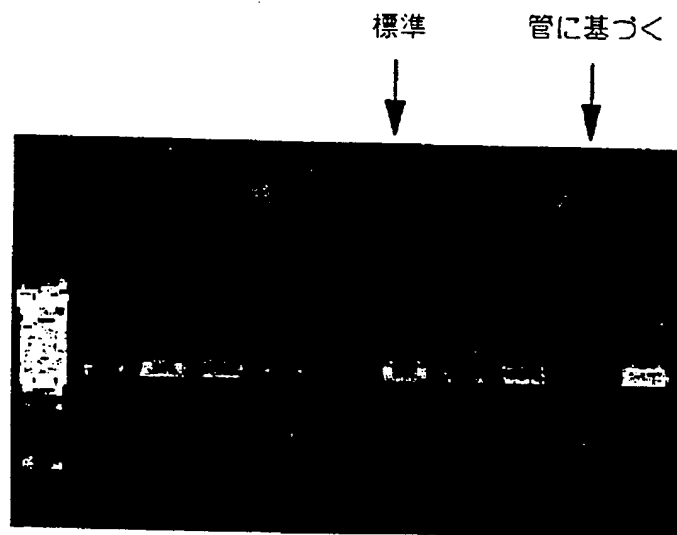


Fig. 10B



【図10】

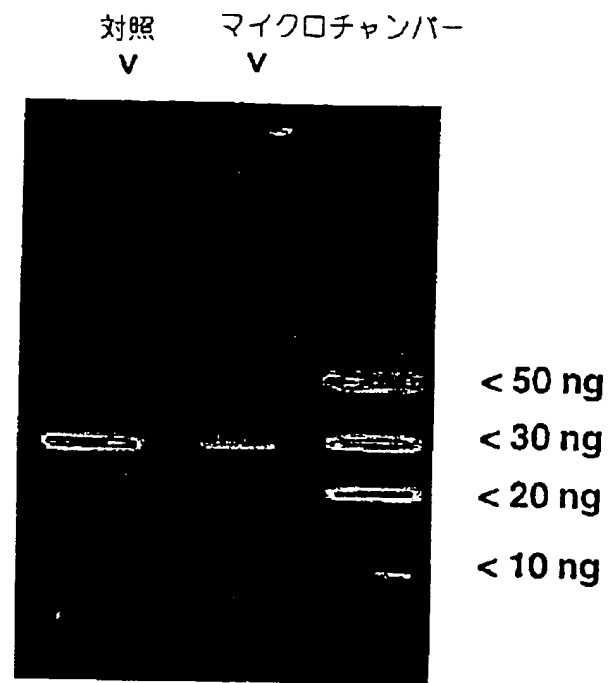


Fig. 10C

【図11】

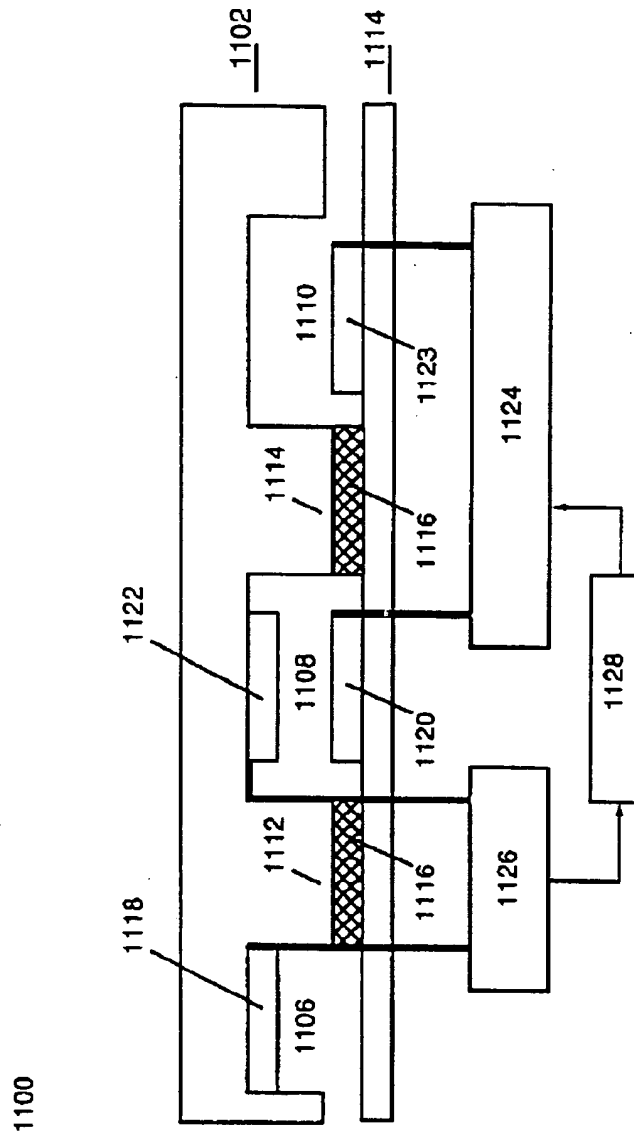


Figure 11

【図 12】

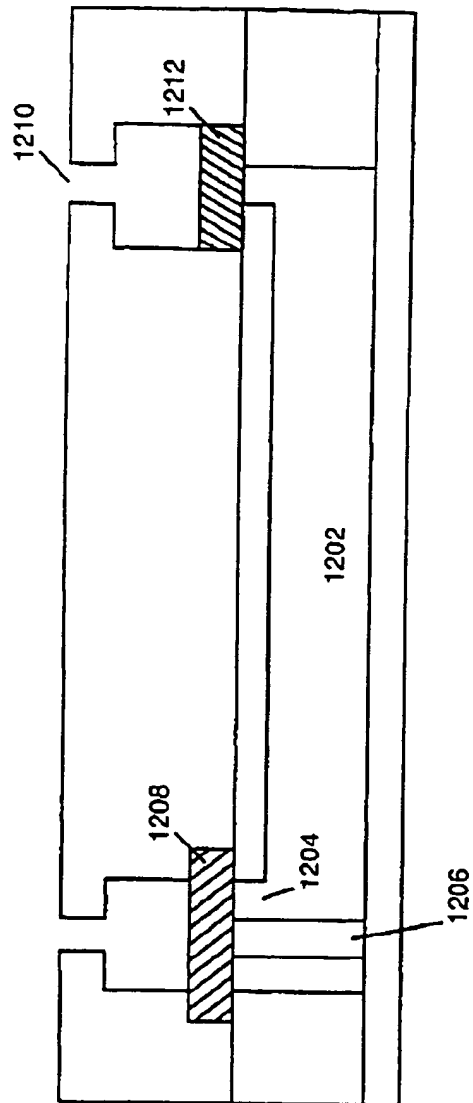


Figure 12a

【図 1 2】

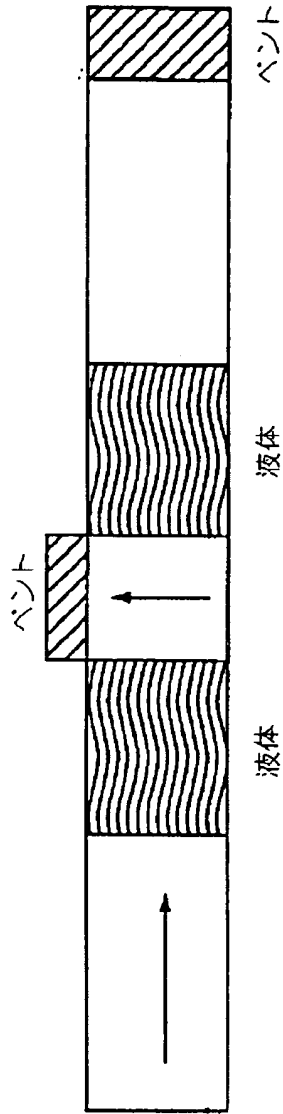


Figure 12b

【図 1 2】

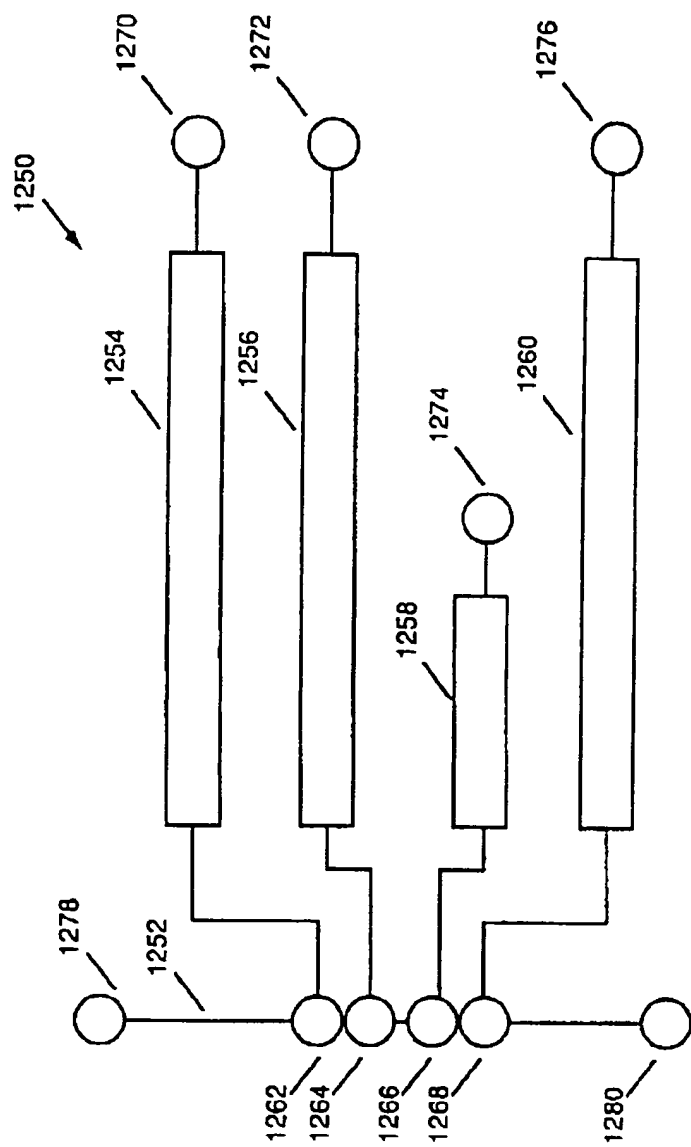


Figure 12c

【図12】

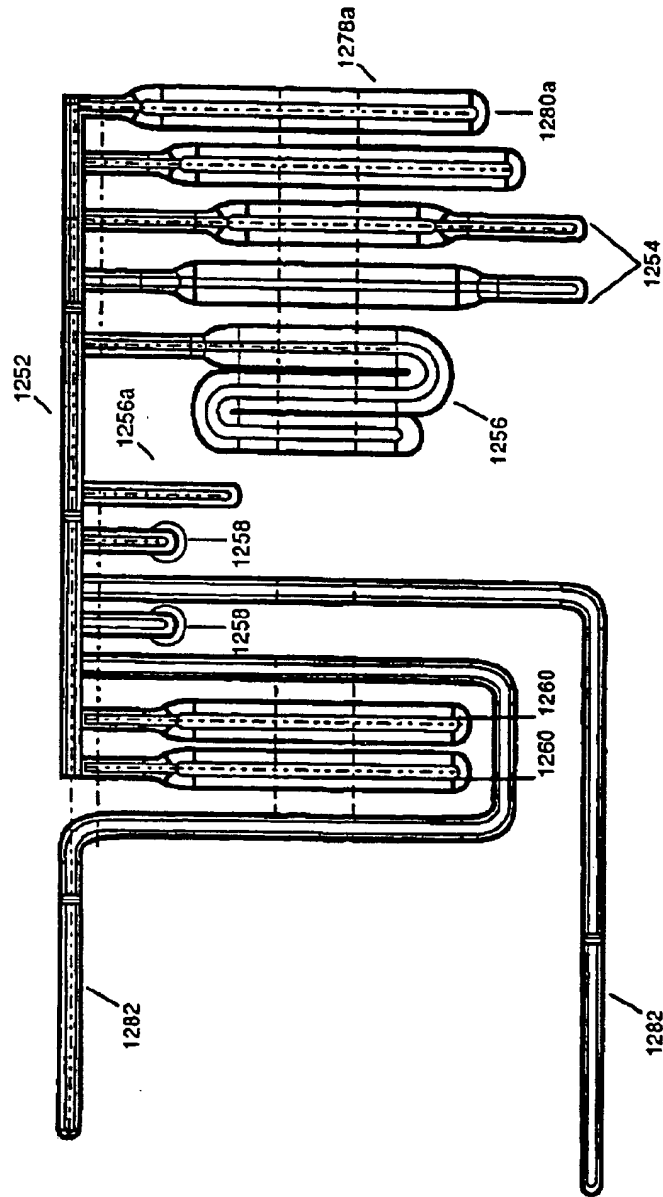


Figure 12d

【図13】

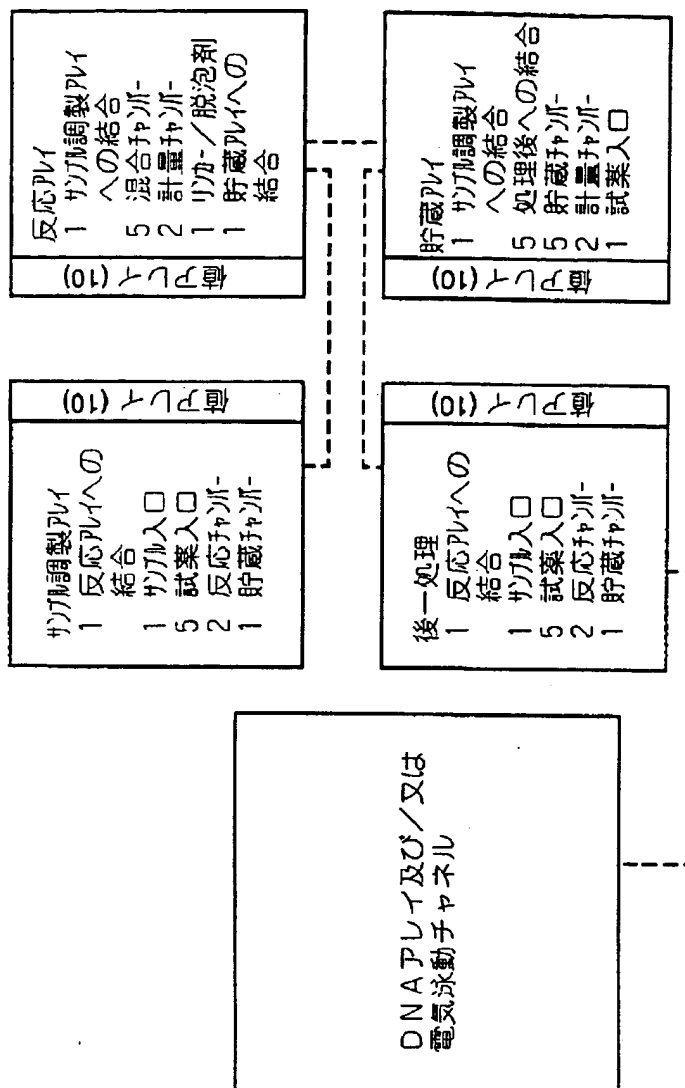


Figure 13

【図14】

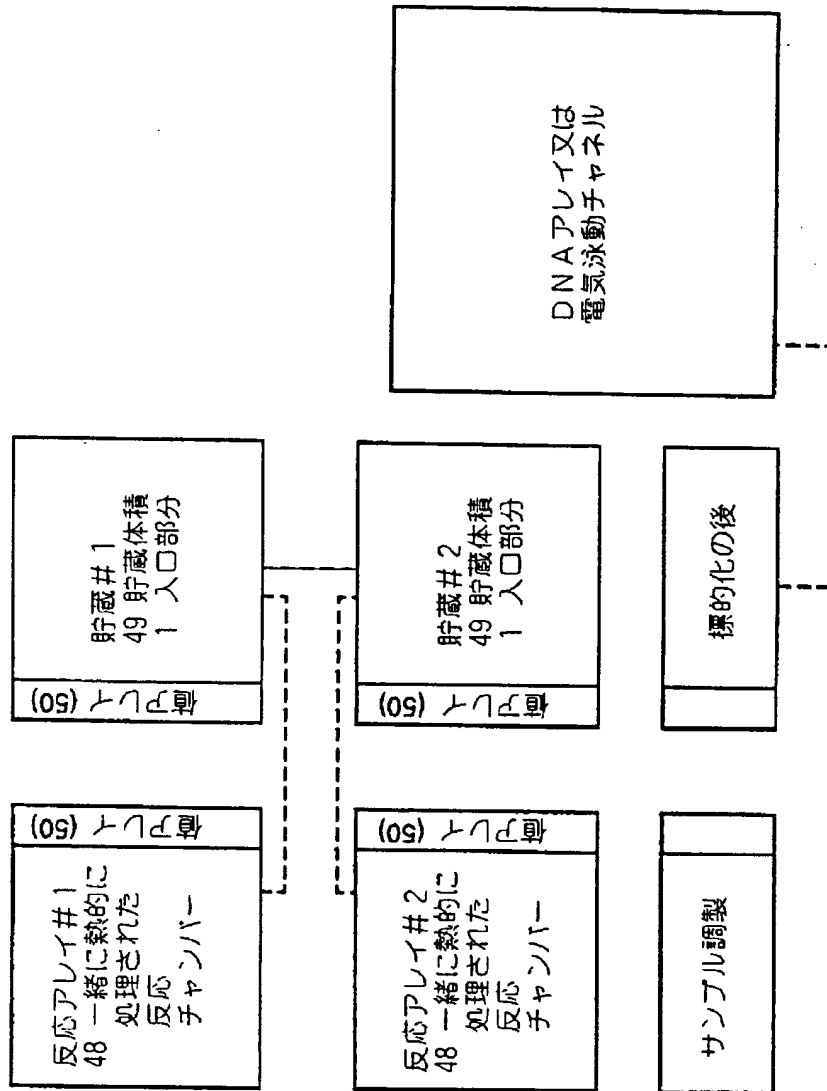


Figure 14



【图15】

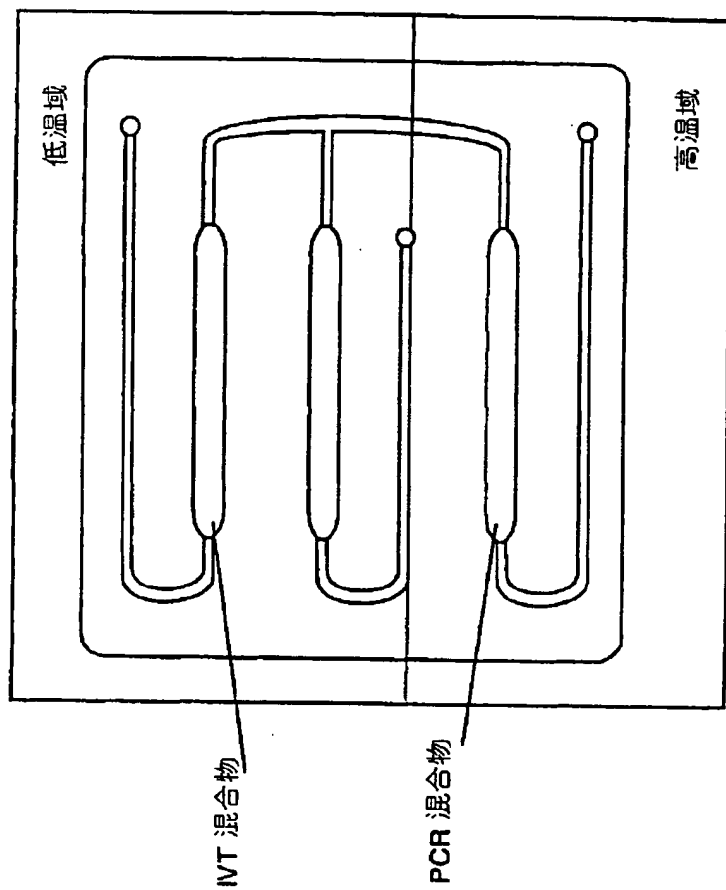


Figure 15a

【図15】

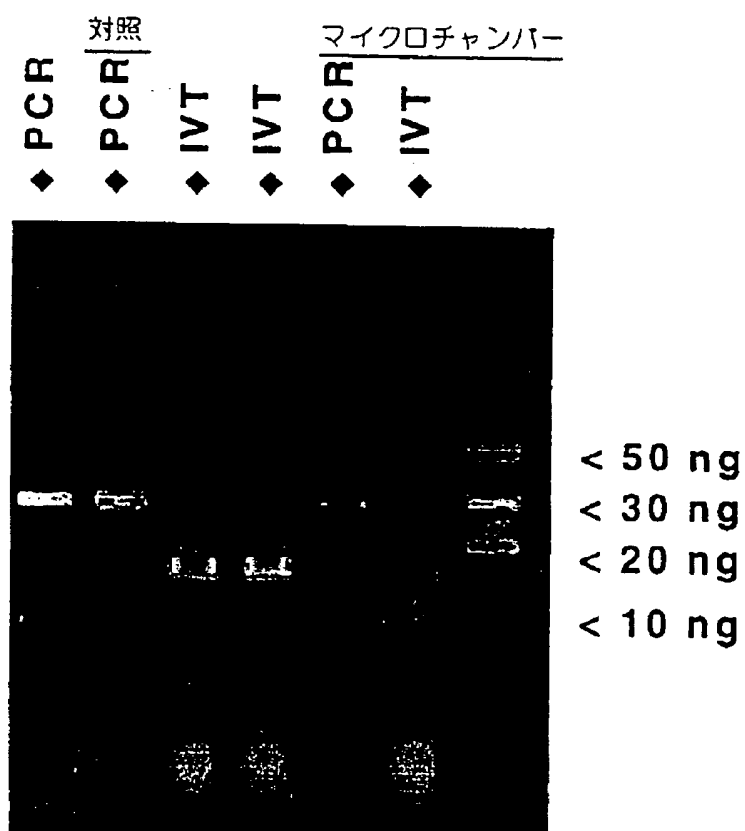


Fig. 15B

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US96/11147

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : C12P 19/34; C12M 1/40

US CL : 435/91.2, 287.2

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : Please See Extra Sheet.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y ----- A	WO 94/05414 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 17 March 1994 (17.03.94), see entire document.	1-11, 18-74, 84-91 ----- 12-17, 75-83
Y ----- A	US 4,426,451 A (COLUMBUS) 17 January 1984 (17.01.84), see entire document.	1-11, 18-55, 84-91 ----- 12-17, 75-83
Y, P	US 5,498,392 A (WILDING ET AL.) 12 March 1996 (12.03.96), see entire document.	25-28, 36-39, 41, 45-48, 66-69

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority (claim) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date (claim)

\*T\* later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 SEPTEMBER 1996

Date of mailing of the international search report

11 OCT 1996

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

WILLIAM H. BEISNER

Telephone No. (703) 308-0651

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1993

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US96/11147

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,304,487 A (WILDING ET AL.) 19 April 1994 (19.04.94), see entire document.	25-28, 36-39, 41, 66-69
Y	WOOLLEY ET AL. Ultra-high speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. Proc. Natl. Acad. Sci. November 1994, Vol. 91, pages 11348-11352, see entire document.	36-42, 61-64, 70- 74
Y	US 5,384,261 A (WINKLER ET AL.) 24 January 1995 (24.01.95), see entire document.	29-32, 56-60
A	US 5,252,294 A (KROY ET AL.) 12 October 1993 (12.10.93), see entire document.	1-91

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US96/11147

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched

Classification System: U.S.

435/6, 91.1, 91.2, 286.1, 286.5, 286.6, 286.7, 287.2, 288.5, 288.6, 288.7, 294.1, 297.5, 305.3, 306.1; 436/43, 94,  
175, 177, 178, 180; 422/68.1, 80, 81, 100, 101, 102; 935/76-78, 85-88; 137/814, 206, 208, 571; 417/118, 121

---

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 08/589,027

(32)優先日 1996年1月19日

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72)発明者 ラバ, リチャード ビー.

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95129,

サンジョゼ, ダンベリー ドライブ 1091

(72)発明者 フォーダー, スティーブン ビー. エー.

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94304,

バロアルト, ネーザン ウェイ 3863